

OPTIMALIZACE METODY STANOVENÍ TRIMETHOPRIMU V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A MEDIKOVANÝCH KRMIVECH POMOCÍ HPLC

MICHAL DOUŠA

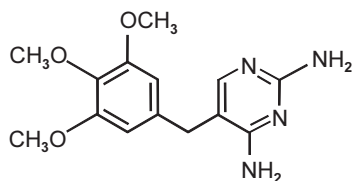
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, Regionální laboratorní oddělení Plzeň
e-mail: michal.dousa@lo.zeus.cz

Došlo dne 13.VI.2001

Klíčová slova: HPLC, trimethoprim, krmivo, fluorescenční detekce

Úvod

Trimethoprim (obr. 1), 5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin-2,4-diamin, se používá ve veterinární medicíně nejčastěji v kombinaci se sulfadiazinem, sulfadoxinem nebo sulfamethoxazolem v poměru 1:5 jako antibakteriální léčivo¹ a je účinný proti širokému spektru mikroorganismů. Jedním ze způsobů jeho podávání je jako součást finálního krmiva. Protože rezidua trimethoprimu mají nepříznivý vliv na člověka, zejména na chronicky nemocné, starší lidi a těhotné ženy, zaměřuje se většina analytických metod stanovení trimethoprimu na jeho stanovení ve vlastním léčivu nebo v dávce léčiva a dále ve zvířecích tkáních, mase a mléce²⁻⁷. Ke stanovení trimethoprimu ve vlastních léčivech nebo v dávce léčiva se používají spektrofotometrické metody⁸⁻¹⁰ nebo metody chromatografické^{11,12}. Metody stanovení trimethoprimu v krmivech se omezují většinou na simultánní stanovení trimethoprimu i příslušného sulfonamidu. Pro detekci 25 nebo 29 veterinárních léčiv používaných v krmivech jako profylaktika, resp. růstové stimulanty, byla aplikována metoda HPLC (cit.¹³). Hlavní výhodou této metody je rychlá identifikace jednoho nebo více těchto aditiv za použití dvou různých elučních systémů HPLC (gradientový a isokratický mód za použití mobilní fáze o složení acetonitril + voda + acetátový pufr) na reverzní fázi C8. K simultánnímu stanovení sulfadimidinu, sulfamethoxypridazinu a trimethoprimu v premixech těchto látek byla vypracována metoda HPLC s UV detekcí při 254 nm (cit.¹⁴). K extrakci trimethoprimu použili autoři přímo mobilní fázi acetonitril + 0,05 M-H₂SO₄ (11+39) a po naředění mobilní fáze se extrakt přímo použije k HPLC analýze v isokratickém módu. Metoda stanovení trimethoprimu a sulfadiazinu v medikovaných krmivech pro ryby byla



Obr. 1. Strukturální vzorec trimethoprimu

publikována v roce 1990 (cit.¹⁵). Sledovaná aditiva byla opakovaně extrahována methanolem a po spojení extraktů a naředění se extrakt použije přímo k HPLC analýze v isokratickém módu za použití mobilní fáze voda + acetonitril + HClO₄ (300+100+0,2) s UV detekcí při 230 nm. Jiná metoda stanovení trimethoprimu a sulfadiazinu v krmivech pro ryby používá extrakci 0,7 % trichloroctovou kyselinou v acetonu za působení ultrazvuku při 40 °C. Po naředění extraktu fosfátovým pufr (0,01 M-Na₂HPO₄, pH 3 + acetonitril (4+1)) se takto získaný extrakt použije přímo k HPLC analýze v isokratickém módu na reverzní fázi C18 za použití mobilní fáze 0,01 M-Na₂HPO₄, pH 2,8 (obsahující 0,1 % triethylaminu) + acetonitril (79 + 21) s UV detekcí při 270 nm. Jako interní standard se používá sulfadimidin. Výtěžnost metody je 100–105 % pro trimethoprim¹⁶. Nevýhodou obou předchozích metod stanovení trimethoprimu je velmi nízká hmotnost navážky vzorku použitého k analýze (1 g), která nemůže obsáhnout nehomogennitu finálního medikovaného krmiva při obvyklém dávkování trimethoprimu 32 mg.kg⁻¹. Navíc jsou obě předchozí simultánní metody stanovení trimethoprimu použitelné pouze pro koncentrace trimethoprimu vyšší než 250 mg.kg⁻¹. Z těchto důvodů jsme se rozhodli vyvinout takovou analytickou metodu, která by umožnila stanovení trimethoprimu v krmivech i pro nízké koncentrační úrovně trimethoprimu a zároveň snížila pravděpodobnost interference matrice.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Přecházení extraktu bylo provedeno na separační jednotce Baker spe 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges C18 (500 mg), resp. OASIS poly(*N*-vinylpyrrolidon-*co*-divinylbenzen) (60 mg) (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování extraktu bylo provedeno na koncentrátoru vzorků Termovap (ECOM, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládal z vysokotlaké pumpy W515, autosampleru W717 Plus Autosampler, spektrofotometrického detektoru W486, fluorescenčního detektoru W474 (vše Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Byla použita chromatografická kolona NovaPak C18, 4 μm, 3,9 × 150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoku bylo měřeno pH-metrem pH 526 (WTW, SRN) s kombinovanou skleněnou elektrodou, který byl kalibrován dvoubodovou kalibrací komerčně dodávanými pufrými CertiPUR pH 4,01 a pH 9,18 (Merck, SRN).

Chemikálie

Acetonitril a kyselina octová byly čistoty pro HPLC (J. T. Baker, USA), sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové čistoty 98+ % (Sigma-Aldrich, USA), triethylamin p.a. (FLUKA, Švýcarsko), dichlormethan, methanol, kyselina sírová a chlorid sodný čistoty p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika), octan sodný trihydrát, kyselina boritá, hydroxid sodný a kysel-

lina fosforečná čistoty UltraPure (Merck, SRN), *o*-ftaldialdehyd a 2-merkapt ethanol čistoty BioChemika (FLUKA, Švýcarsko).

Extrakční směs pro premixy byla připravena smísením 200 ml methanolu a 800 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹). Promývací činidlo pro extrakci na pevné fázi bylo připraveno smísením 5 ml methanolu a 95 ml vody. Extrakční roztok k extrakci kapalina–kapalina byl připraven smísením 450 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹) a 50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného. Borátový pufr byl připraven rozpuštěním 2,47 g kyseliny borité ve 200 ml vody a pH bylo upraveno roztokem 1 mol.l⁻¹ NaOH na hodnotu 9,5. Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 100 mg *o*-ftaldialdehydu (OPA) v 9 ml methanolu; potom bylo přidán 1 ml borátového pufru, 100 µl 2-merkapt ethanolu a směs byla promíchána. Octanový pufr byl připraven rozpuštěním 19,05 g trihydrátu octanu sodného v 1000 ml vody a pH bylo upraveno kyselinou octovou na hodnotu 7,0.

Mobilní fáze I byla připravena smísením 170 ml acetonitrilu, 830 ml demineralizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, USA), 4 ml kyseliny fosforečné a 2 ml triethylaminu. V mobilní fázi se rozpustilo 0,9411 g sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové (0,005 mol.l⁻¹) a pH mobilní fáze se upravila triethylaminem na hodnotu pH 3,0.

Mobilní fáze II byla připravena smísením 180 ml acetonitrilu a 820 ml octanového pufru pH 7,0.

Kalibrační roztoky o koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg.l⁻¹ byly připraveny postupným ředěním základního roztoku trimethoprimu (Riedel-deHaën, SRN) v methanolu o koncentraci 200 mg.l⁻¹ mobilní fázi.

Princip metody

Trimethoprim se extrahuje methanolickým roztokem kyseliny sírové nebo dichlormethanem pro premixy, resp. medikované krmné směsi. V případě premixů se extrakt se naředí, v případě finálních krmných směsí se přečistí reextrakcí zředěnou kyselinou sírovou a extrakcí na pevné fázi C18. Trimethoprim se stanoví na reverzní fázi s iontovými páry a UV detekcí při 271 nm.

Standardní operační postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo jeho přehřátí. 6 g zkušební vzorku premixu se extrahuje 150 ml extrakční směsí po dobu 30 minut v kónické baňce 500 ml na laboratorní třepačce. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu a po naředění mobilní fází se nanáší na chromatografickou kolonu. Při analýze medikovaných krmných směsí se postupuje následovně: 20 g zkušební vzorku krmné směsí se extrahuje 120 minut v Soxhletově extraktoru 150 ml dichlormethanu tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně ke čtyřem přetokům dichlormethanu. Po této době se extrakce přeruší, dichlormethanový extrakt se odpaří pod proudem dusíku na poloviční objem a dichlormethanem se kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml. Přečištění extraktu se provede reextrakcí trimethoprimu do zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹) a následnou preseparací na pevné fázi C18. 40 ml získaného dichlormethanového extraktu se 4x reextrahuje 25 ml zředěné kyseliny sírové (0,15 mol.l⁻¹), při-

čemž tyto extrakty se jímají v odměrné baňce na 100 ml. Zbytky dichlormethanu se odfoukají při teplotě asi 50 °C proudem dusíku a odměrná baňka se doplní vodou po značku. Na kolonku C18 kondicionovanou 5 ml methanolu a 5 ml vody se pipetuje 5,0 ml extraktu. Kolonka se promyje 5 ml promývacího činidla (methanol + voda, 5+95) a zbytky promývacího činidla se odstraní proudem vzduchu asi 1 minutu. Trimethoprim se eluuje 2 ml methanolu do odměrné baňky na 2 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku při 55 °C téměř k suchu a odparek se rozpustí v mobilní fázi. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu a dávkuje na chromatografickou kolonu. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Podmínky pro HPLC

Parametr	Hodnota
Průtok mobilní fáze	0,8 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	38 °C
Detektor UV	271 ^a nm (288 ^b nm)
Objem nástřiku	25 µl
Kolona	NovaPak C18, 4 µm, 3,9 × 150 mm

^a Pro mobilní fázi I, ^b pro mobilní fázi II

Derivatizace trimethoprimu

Ke zvýšení selektivity a citlivosti je možné použít předkolonovou derivatizaci trimethoprimu *o*-ftaldialdehydem. Reakční mechanismus derivatizační reakce byl již popsán a je možné použít předkolonové derivatizace¹⁷ nebo derivatizace za kolonou¹⁸ za vzniku derivátů s excitačním maximem mezi 330 až 360 nm a emisním maximem 450 nm. Předkolonová derivatizace trimethoprimu byla uskutečněna v odměrné baňce na 2 ml následovně: ke 100 µl standardu nebo vzorku se přidalo 200 µl borátového pufru, 100 µl roztoku derivatizačního činidla OPA, vše se promíchalo a počkalo se 200 s. Poté se směs neutralizovala 100 µl 0,75 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové, doplnila vodou po značku a promíchala. K separaci derivátů byl použit lineární gradient mobilní fáze A od 55 % do 80 % z 0 do 10 minut při teplotě 38 °C, poté byl gradient vrácen během 1 minuty na počáteční hodnotu a kolona ekvilibrována 5 minut. Jako mobilní fáze A byla použita mobilní fáze o složení acetonitril + voda (60/40, v/v) a mobilní fází B byl octanový pufr pH 7,0. Gradient mobilní fáze ani teplota nebyly optimalizovány.

Výsledky a diskuse

Správnost a přesnost

Vzhledem k tomu, že certifikované referenční materiály nejsou dostupné, byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva (45 % pšenice, 25 % ječmen, 12 % sójový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % úsušky píce a 5 % vápenec)

s přidavkem trimethoprimu o koncentrační hladině 15, 25, 35 a 45 mg.kg⁻¹. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5x. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 15 až 45 mg.kg⁻¹ je (99,4±5,7) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu 1,4021±3,6194 a statisticky se neliší od nuly. Konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu 0,9403±0,1117 a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje správné výsledky.

Tabulka II

Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí (hladina významnosti $P = 0,95$)

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg.kg ⁻¹]	16,3	25,2	34,8	45,7
Nalezená hodnota [mg.kg ⁻¹]	17,1	24,5	34,5	44,4
Výtěžek metody [%]	104,6	97,0	99,1	97,0
Interval spolehlivosti [%]	2,8	3,0	2,0	2,8
Relativní směrodatná odchylka [%]	0,30	0,46	0,44	0,79

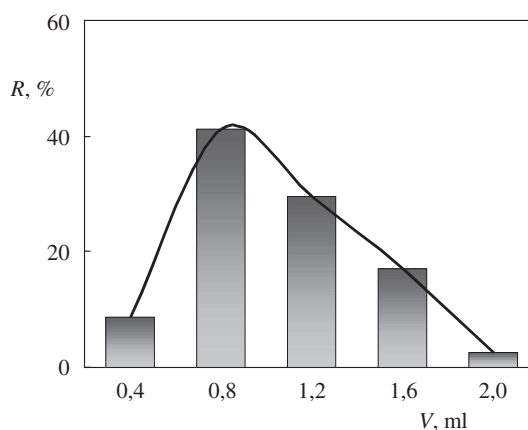
Volba přečištění extraktu

Byla sledována výtěžnost extrakce kapalina–kapalina v systému dichlormethan –0,15 mol.l⁻¹ kyselina sírová, spotřeba desorpčního činidla a výtěžek extrakce na pevné fázi.

Pro výpočet výtěžku extrakce kapalina–kapalina byl stanoven distribuční koncentrační poměr $D_c = 81,6$. Pro poměr objemu obou fází $r = 0,625$ je výtěžek dělení $R = 0,981$ pro jeden stupeň extrakce $n = 1$. Pro kvantitativní výtěžek trimethoprimu $R = 0,9999$ je nutný počet stupňů extrakce $n = 2,33$ při zachování stejného poměru objemu obou fází. Ze získaných experimentálních dat je zřejmé, že při výše uvedených podmínkách extrakce trimethoprimu extrakcí kapalina–kapalina je výtěžek extrakce kvantitativní.

K přečištění extraktu na pevné fázi byly zkoumány dva chromatografické systémy – extrakce na pevné fázi C18 a OASIS. Postup extrakce byl u obou sorbentů stejný, ale protože jsme u pevné fáze OASIS použili pouze 60 mg sorbentu, byly vzhledem k nižší sorpční kapacitě sníženy objemy extraktu a promývacího činidla na 1 ml. Průměrný výtěžek extrakce ze tří měření na sorbentu C18 byl 98,4 % a na sorbentu OASIS pouhých 71,8 %, proto jsme dále optimalizovali pouze extrakci na sorbentu C18. Spotřeba desorpčního činidla je patrná z elučního profilu trimethoprimu z pevné fáze C18 (obr. 2). Měřením bylo zjištěno, že ke kvantitativní desorpci trimethoprimu postačují 2 ml methanolu.

Přesnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků, jejichž celkový počet byl 15.



Obr. 2. Eluční profil trimethoprimu na pevné fázi Sep Pak Silica (R – výtěžnost, V – objem desorpčního činidla)

Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 22,0 až 34,0 mg.kg⁻¹ má opakovatelnost hodnotu 2,3 mg.kg⁻¹.

Optimalizace extrakce pevná fáze – kapalina

Extrakce byla optimalizována sledováním výtěžku extrakce při změně poměru navážky a objemu extrakčního činidla a doby extrakce. Tato optimalizace byla provedena pouze u premixů doplňkových látek, ve kterých je koncentrace trimethoprimu řádově 200–500x vyšší než ve finálních medikovaných krmivech. Byl připraven modelový vzorek premixu trimethoprimu o koncentrační hladině 23 000 mg.kg⁻¹. Poměr navážky a objemu extrakčního činidla byl upravován změnou objemu extrakčního činidla při konstantní hmotnosti navážky 5 g. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 3x. Z experimentu je zřejmé, že již od doby extrakce 10 minut dostáváme kvantitativní výtěžky trimethoprimu pro poměr navážky a objemu extrakčního činidla 1:25 až 1:50.

Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byla optimalizována tak, aby kapacitní poměr byl $k \geq 2,5$, počet teoretických pater $N \geq 5 000$ a asymetrický faktor $t_a \leq 1,2$. V obou mobilních fázích byl sledován vliv koncentrace acetonitrilu a u mobilní fáze I vliv koncentrace iontového páru (protiiontu) v mobilní fázi na kapacitní poměr a vliv pH mobilní fáze na retenční faktor.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla ϕ (vyjádřeného jako molární zlomek) v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky k byl popsán rovnicí¹⁹:

$$k = k_a 10^{-m\phi} \quad (1)$$

kde retenční faktor k_a je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů a m je parametr přímo závislý na síle organického rozpouštědla a považován za konstantu. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

$$\log k = \log k_a - m\phi \quad (2)$$

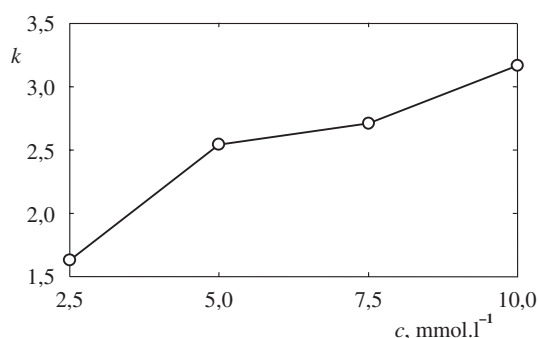
a logaritmy retenčních faktorů se snižují s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byla zjištěna lineární závislost mezi koncentrací acetonitrilu (v koncentračním rozmezí $\varphi = 0,14$ až $0,22$) a logaritmem retenčního faktoru a rovnice pro mobilní fázi I má tvar $\log k = 2,129 - 9,638 \varphi$, korelační koeficient $r = -0,9997$. Pro mobilní fázi II má rovnice tvar $\log k = 1,920 - 8,2942 \varphi$, korelační koeficient $r = -0,9971$.

Vliv koncentrace protiiontu na retenční faktor byl sledován pro látkové množství 2,5; 5,0; 7,5 a 10 mmol.l⁻¹ sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové v mobilní fázi. Podle předpokladu retence trimethoprimu roste s koncentrací protiiontu a optimální koncentrace leží v rozmezí 5 až 7,5 mmol.l⁻¹, kdy se mění retence trimethoprimu vlivem koncentrace protiiontu nejméně (obr. 3).

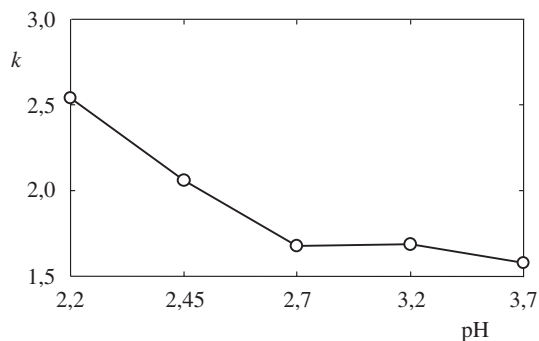
Tabulka III

Porovnání chromatografických charakteristik optimalizovaných mobilních fází

Chromatografická charakteristika	Mobilní fáze	
	I	II
Retenční čas [min]	4,96	4,89
Retenční faktor k	2,54	2,49
Počet teoretických pater N	5 500	5 900
Asymetrický faktor t_a	1,11	1,15



Obr. 3. Vliv koncentrace c protiiontu sodné soli hexan-1-sulfonové kyseliny v mobilní fázi na retenční faktor k trimethoprimu



Obr. 4. Vliv pH mobilní fáze na retenční faktor k trimethoprimu

Při sledování vlivu pH mobilní fáze na retenční faktor trimethoprimu bylo pH mobilní fáze upraveno vždy triethylaminem nebo kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu. Optimální pH mobilní fáze leží v oblasti pH 2,7 až 3,7, kdy nedochází ke změně retence trimethoprimu (obr. 4). Vliv pH mobilní fáze II na retenční faktor trimethoprimu nebyl optimalizován.

Teplota separace nebyla optimalizována. Porovnání chromatografických parametrů pro obě optimalizované mobilní fáze je uvedeno v tabulce III.

Linearity

Neznámé koncentrace byly vyhodnocovány z kalibrační přímky. Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vycházelo z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závisle proměnné, použitím metody nejmenších čtverců. Rovnice kalibrační přímky má pro mobilní fázi I tvar: $plocha = (6\,265 \pm 927) + (24\,809 \pm 42) \times koncentrace$ (mg.l⁻¹), korelační koeficient $r = 0,99999$; pro mobilní fázi II má rovnice kalibrační přímky tvar: $plocha = (-5\,863 \pm 2\,568) + (31\,12280) \times koncentrace$ (mg.l⁻¹), korelační koeficient $r = 0,99999$. Kalibrační přímky jsou lineární v rozsahu 0,1–1,0 mg.

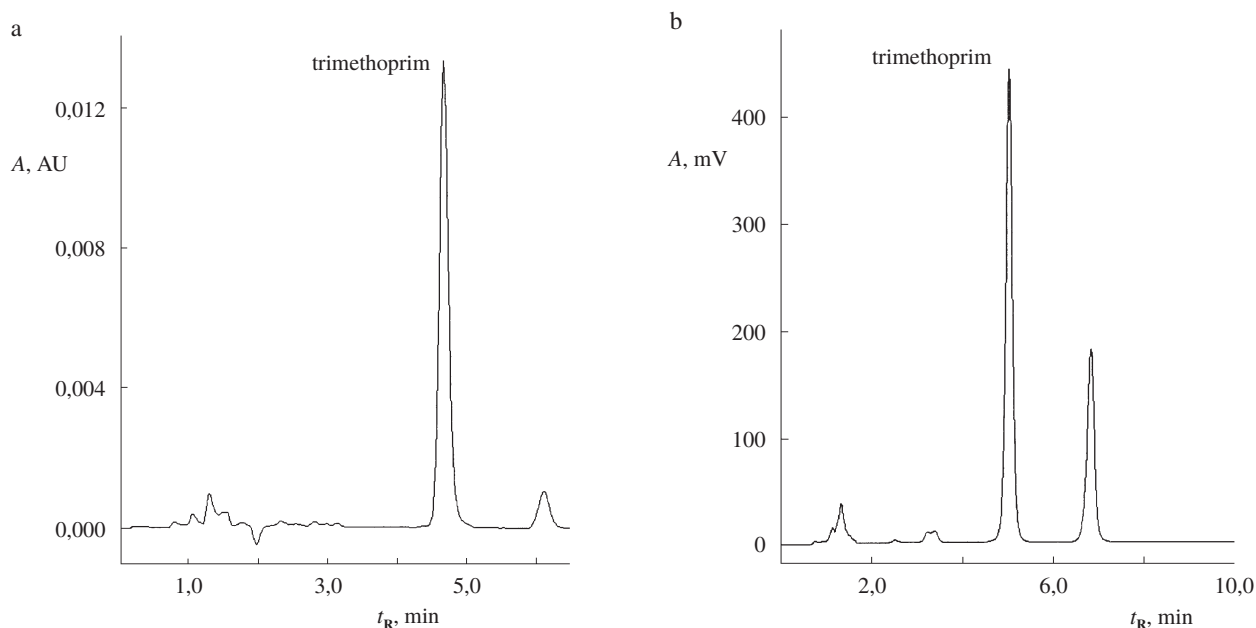
Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1 - \alpha)$ procentního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá rovná hodnotě 0,1 (cit.²⁰). Pro mobilní fázi I byly vypočteny následující hodnoty: mez detekce má hodnotu 0,35 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 0,7 mg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,52 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 1,0 mg.kg⁻¹. Pro mobilní fázi II byly vypočteny následující hodnoty: mez detekce má hodnotu 2,3 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 4,6 mg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 2,8 mg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 5,6 mg.kg⁻¹.

Detekce

Absorpční spektra trimethoprimu jsou závislá na pH prostředí a vykazují dvě absorpční maxima při 225 nm a 288 nm při pH 7 (cit.²¹). Snížením pH prostředí dochází k hypsochromnímu posunu druhého absorpčního maxima na 271 nm. Příprava vzorku, přečištění extraktu a následná separace trimethoprimu na chromatografické koloně zaručuje dostatečnou citlivost i selektivitu stanovení trimethoprimu i za použití UV detekce při 271 nm, resp. 288 nm v závislosti na použité mobilní fázi a nedochází k žádným kolonovým interferencím (obr. 5).

Použitím derivatizace trimethoprimu došlo k výraznému zvýšení citlivosti a snížení meze stanovitelnosti. K fluorescenční detekci byla použita emisní vlnová délka 450 nm s excitační vlnovou délkou 330 nm. Kalibrační přímka je lineární v rozsahu 5–50 pg, mez detekce má hodnotu 3,4 μg.l⁻¹,



Obr. 5. Separace trimethoprimu na chromatografické koloně C18; a – s iontopárovým činidlem – krmná směs s obsahem 30 mg.kg⁻¹, chromatografické podmínky viz tabulka I, b – standard trimethoprimu 8 µg.l⁻¹, chromatografické podmínky v textu

tj. pro daný standardní operační postup 6,8 µg.kg⁻¹, mez stanovitelnosti má hodnotu 4,1 µg.l⁻¹, tj. pro daný standardní operační postup 8,2 µg.kg⁻¹.

LITERATURA

- Bushby S. R. M.: J. Am. Vet. Med. Assoc. 176, 1049 (1980).
- Schuch R., Schwaiger I.: Ernährung 24, 413 (2000).
- Brandšteterová E., Kubalec P., Macháčková L.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A 204, 341 (1997).
- Dagorn M., Delmas J. M.: Anal. Chim. Acta 285, 353 (1994).
- Gentleman M. S., Burt H. M.: J. Chromatogr. 633, 105 (1993).
- Nachilobe P., Boison J. O., Cassidy R. M., Fesser A. C. E.: J. Chromatogr. 616, 243 (1993).
- Hormazabal V., Rogstad A.: J. Chromatogr. 583, 201 (1992).
- Korany M. A., Wahbi A. M., Elsayed M. A., Mandour S.: Anal. Lett. 17, 1373 (1984).
- Othman S.: Int. J. Pharm. 63, 173 (1990).
- Sanyal A. K., Laha T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1447 (1983).
- Berg J. J., Breytenbach J. C., Du Preez J. L.: J. Chromatogr. 513, 392 (1990).
- Tammilehto S. A.: J. Chromatogr. 323, 456 (1985).
- Genouel C., Rues M. C., Desplanques D.: Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol. 91, 175 (1998).
- Torel J., Cillard J., Cillard P., Vie M.: J. Chromatogr. 323, 447 (1985).
- McNally V., Lenehan T., Kelly M. T., Smyth M. R.: Anal. Lett. 23, 2215 (1990).
- Hormazabal V., Steffenak I., Yndestad M.: J. Chromatogr. 648, 183 (1993).
- Roth M.: Anal. Chem. 43, 880 (1971).
- Roth M., Hampai A.: J. Chromatogr. 83, 353 (1973).
- Berendsen G. E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980).
- Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
- Bonazzi D., Andrisano V., Di Pietra A. M., Cavrini V.: Farmaco 49, 381 (1994).

M. Douša (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Plzeň): **Optimization of the HPLC Method of Trimethoprim Determination in Additive Premixes and Medicated Fodders**

An HPLC method was developed for rapid determination of trimethoprim in additive premixes, in final fodders, and in contaminated final fodders. Trimethoprim is extracted from the sample with acidified aqueous methanol or dichloromethane and, after dilution of the methanolic extract or purification of the dichloromethane extract by re-extraction into 0.15 mol.l⁻¹ H₂SO₄ and on the solid phase C18, it is determined by reverse-phase chromatography on C18 with UV detection. The composition of the mobile phase was optimized. The limit of determination (2 mg.kg⁻¹) and the yield of the method at trimethoprim concentrations 15–45 mg.kg⁻¹ (99.4±5.7 %) were determined. The repeatability was not determined due to a low number of real samples of final fodders. To lower the limit of determination, fluorescent detection was used after precolumn derivatization of trimethoprim with phthalaldehyde. The calculated limit of detection was then 15 mg.kg⁻¹.