

## OPTIMALIZACE METODY HPLC PRO STANOVENÍ AMPROLIA V KRMIVECH PRO OBSAHY MENŠÍ NEŽ 5 mg.kg<sup>-1</sup> S POSTKOLONOVOU DERIVATIZACÍ

LÝDIE DUDÍKOVÁ<sup>a</sup>, DANUŠE NENÁHLOVÁ<sup>a</sup>,  
ALENA BREBURDOVÁ<sup>a</sup> a MICHAL DOUŠA<sup>b</sup>

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, <sup>a</sup>Regionální laboratorní oddělení Praha, Za opravnou 4, 150 06 Praha, <sup>b</sup>Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň  
e-mail: lydie.dudikova@lo.zeus.cz, michal.dousa@lo.zeus.cz

Došlo dne 4.III.2002

Klíčová slova: HPLC, amprolium, krmivo, optimalizace metody

### Úvod

Amprolium (obr. 1, *I*), 1-[4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl]-methyl]-2-methylpyridinium-chlorid, se používá jako účinné antikokcidikum ve výkrmu kuřat a krůtat a odchovu kuřic a bažantů řádově v obsazích 62,5–125 mg.kg<sup>-1</sup> finálního krmiva<sup>1</sup>; ochranná lhůta je 3 dny.

Stanovení amprolia v krmivech, které bylo také zapracováno do metod sdružení Association of Official Analytical Chemists (AOAC), bylo založeno na práci Szalkowského<sup>2,3</sup>. Kritické zhodnocení této práce v roce 1970 bylo publikováno Brügemannem<sup>4</sup>, který později použil k přečištění extraktu kolonové chromatografie na iontoměničích. Pozdější modifikace metody, která byla testována na krmných směsích, byla popsána Severjinenem<sup>5</sup>. Ze zkušebního vzorku krmiva se amprolium extrahuje směsí methanol/voda (2/1) a po úpravě pH hydroxidem sodným na hodnotu pH 8 je reextrahováno do dichlormethanu a následně je tento extrakt přečištěn na kyselém oxidu hlinitém. Amprolium se po reakci v alkalickém prostředí hydroxidu sodného s 2,7-dihydroxynaftalenem za přítomnosti kyanidu draselného a hexakynoželezitanu draselného stanoví spektrofotometricky při 530 nm. Směrodatná odchylka stanovení byla vypočtena na 4 % relat. a nebyly zjištěny žádné interference matrice. Výše popsaná metoda byla zapracována rovněž do metodik (AOAC) (cit.<sup>6</sup>). Nevýhodou metody je vysoká hodnota slepého pokusu a nízký rozsah linearit<sup>5</sup>. Výtěžnost metody je silně závislá na kyselosti použitého oxidu hlinitého<sup>7</sup>. Fluorometrická metoda stanovení

amprolia založená na vzniku amprochromu reakcí s hexakynoželezitanem draselným v přítomnosti hydroxidu sodného je rovněž oficiální metodou AOAC. Vzniklý fluoreskující derivát se extrahuje do butan-1-olu a měří se při 455 nm s excitační vlnovou délkou 400 nm (cit.<sup>8</sup>). Jsou-li přítomna antibiotika, dochází ke zkreslení výsledků. Polarografické stanovení amprolia v premixech popsali Stolejda a Růžička<sup>9</sup>. Amprolium je extrahováno ethanolem a po převedení do elektrolytu 0,1 M-HCl + 0,1 M-LiCl poskytuje katodickou vlnu v potenciálovém rozmezí od -0,8 V do -1,4 V (proti SKE). K vyhodnocení obsahu amprolia byla použita vzhledem k matici vzorku metoda standardního přídatku.

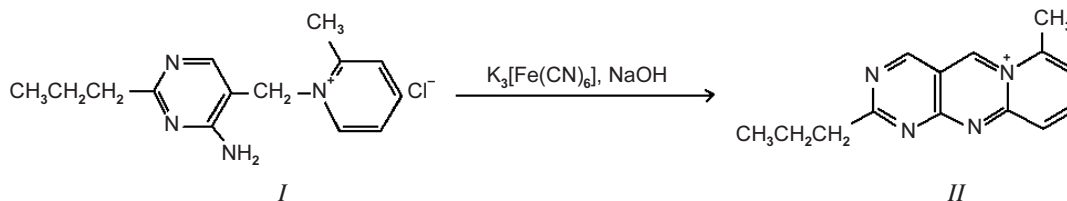
Ke stanovení amprolia v krmivech byly popsány metody HPLC, kdy k separaci amprolia byla použita iontová chromatografie<sup>10</sup> nebo separace na normální fázi silikagelu<sup>11</sup>. V roce 1988 byla publikována metoda, při níž bylo k separaci amprolia poprvé využito iontových párů (dioktyl-sulfosukcinát) na reverzní fázi C18 s UV detekcí při 270 nm (cit.<sup>12</sup>). Amprolium se extrahuje směsným rozpouštědlem methanol-voda (2/1) obsahujícím dioktyl-sulfosukcinát (5 mM) a chlorid vápenatý (10 mM). K přečištění extraktu se využívá tuhá fáze – kyselý oxid hlinitý. Výtěžnost metody byla vypočtena na 100,1 % a mezilaboratorní směrodatná odchylka stanovení vypočtená z mezilaboratorního porovnávacího testu je 3,2 %. Využití separace iontových párů s dioktyl-sulfosukcinátem bylo použito i v dalších metodách HPLC (cit.<sup>13,14</sup>). Ke stanovení nízkých obsahů amprolia a jeho reziduí byla využita reakce amprolia s hexakynoželezitanem draselným v přítomnosti hydroxidu sodného za vzniku fluoreskujícího derivátu – amprochromu (obr. 1, *II*). Reakce probíhá za kolonou, detekční limit je 3 μg.kg<sup>-1</sup> a metoda byla aplikována na stanovení amprolia ve vaječném žloutku<sup>15</sup>.

Na základě požadavků §7 zákona o krmivech<sup>16</sup> Ministerstvo zemědělství České republiky ukládá i u výrobků uváděných do oběhu monitorování výskytu nežádoucích doplňkových látek, mezi něž patří amprolium. V souladu s koncepcí pro monitorování nežádoucích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která by byla dostatečně selektivní pro koncentrační hladiny amprolia v μg.kg<sup>-1</sup>.

### Experimentální část

#### Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepače LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Přečištění extraktu bylo provedeno na separační jednotce BAKER SPE 12G (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování extraktu bylo



Obr. 1. Derivatizační reakce amprolia hexakynoželezitanem draselným v prostředí hydroxidu sodného

Tabulka I  
Podmínky HPLC

Parametr	Hodnota
Kolona	SymmetryShield RP <sub>8</sub> , 4 µm, 3,9×150 mm
Průtok mobilní fáze	0,8 ml.min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze	složení je uvedeno v textu
Průtok derivatizačního činidla	0,6 ml.min <sup>-1</sup>
Objem derivatizační smyčky	1000 µl
Teplota derivatizační smyčky	45±1 °C
Teplota kolony	laboratorní
Objem nástřiku	10 µl
Detektor	fluorescenční excitační vlnová délka 365 nm, emisní vlnová délka 470 nm

Tabulka II  
Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí

Parametr	Hodnota		
Očekávaná hodnota [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,545	2,145	5,095
Nalezená hodnota [mg.kg <sup>-1</sup> ]	0,570	2,163	5,132
Výtěžek metody [%]	104,6	100,8	100,7
Interval spolehlivosti	2,110	3,700	1,850
Relativní směrodatná odchylka [%]	0,30	0,46	0,44

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 skládá z vysokotlaké pumpy W515, autosampleru W717 Plus Autosampler a fluorimetrického detektoru W470 (vše Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Derivatizační smyčka RXN 1000 Coil Kit (Waters, Milford, USA) byla umístěna do termostatu Column Temperature Control Systém (Waters, Milford, USA) a byla zařazena mezi chromatografickou kolonu a detektor pomocí směšovací komůrky Mixer Cartridge 50 µl (Supelco, USA). K derivatizaci byla použita vysokotlaká pumpa W515 (Waters, Milford, USA). K separaci byla použita chromatografická kolona SymmetryShield RP<sub>8</sub>, 4 µm, 3,9×150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoku bylo měřeno pH-metrem pH 526 (WTW, SRN) s kombinovanou skleněnou elektrodou a přístroj byl kalibrován na ftalátový pufr pH 4,01.

## Chemikálie

Acetonitril a kyselina octová byly čistoty HPLC grade (J. T. Baker, USA), sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové čistoty 98 % (Sigma-Aldrich, USA), triethylamin p.a. (FLUKA, Švýcarsko), dichlormethan, methanol, hydroxid sodný a hexakynoželezitan draselný p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika), kyselina fosforečná čistoty UltraPure (MERCK, SRN), demineralizovaná voda (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, USA), základní roztok amprolia (Riedel-de-Haën, SRN).

Extrakční směs pro extrakci amprolia byla připravena smísením 100 ml methanolu a 900 ml dichlormethanu.

Mobilní fáze byla připravena smísením 80 ml acetonitrilu, 910 ml demineralizované vody, 5 ml kyseliny fosforečné a 5 ml triethylaminu. V mobilní fázi bylo rozpuštěno 1,42 g sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové (0,0075 mol.l<sup>-1</sup>) a její pH bylo upraveno roztokem triethylaminu na hodnotu 3,0.

Derivatizační roztok k postkolonové derivatizaci byl připraven rozpuštěním 37,5 g hydroxidu sodného ve 200 ml vody, po přidavku 15 ml 1% roztoku hexakynoželezitanu draselného ve vodě a vytemperování roztoku na laboratorní teplotu byl objem roztoku doplněn vodou na 250 ml.

Kalibrační roztoky o koncentraci 0,4; 0,8; 2,0 a 4,0 mg.l<sup>-1</sup> byly připraveny postupným ředěním základního roztoku amprolia v methanolu o koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup> mobilní fázi.

## Princip metody

Amprolium se extrahuje ze vzorku extrakčním činidlem methanol–dichlormethan (100/900) a takto získaný extrakt se přečistí extrakcí na pevné fázi silikagelu. Amprolium se stanoví metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C8 s iontovými páry s postkolonovou derivatizací hexakynoželezitanem draselným v alkalickém prostředí hydroxidu sodného s fluorescenční detekcí. Metoda je použitelná pro obsahy amprolia od 0,1 mg.kg<sup>-1</sup>.

## Standardní operační postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. 45 g zkušebního vzorku se extrahuje 150 ml extrakční směsí 30 minut v kónické baňce objemu 500 ml na laboratorní třepačce a pak 2 minuty na ultrazvukové lázni; takto získaný extrakt se přečistí na pevné fázi silikagelu.

## Přečištění extrakcí na pevné fázi

Na kolonku Sep-Pak Plus Silica kondicionovanou 5 ml extrakčního činidla se odměří 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, poté se promyje 10 ml promývacího činidla. Kolonka se nechá 25 minut prosávat vzduchem do odstranění zbytků extrakčního roztoku. Amprolium se eluuje do odměrné baňky

objemu 2 ml mobilní fáze po značku. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při  $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$  a dávkuje se na chromatografickou kolonu. Podmínky pro HPLC jsou uvedeny v tabulce I.

## 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 % sojový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % úsušky pšicín a 5 % vápenec) s přidávkou amprolia o koncentrační hladině 0,5; 2,0 a 5,0  $\text{mg.kg}^{-1}$ . 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 0,5 až 5,0  $\text{mg.kg}^{-1}$  je  $(102,0 \pm 5,5)\%$ . Nalezené hodnoty modelového vzorku byly srovnány s očekávanými hodnotami pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta  $a$  regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu  $0,0186 \pm 0,0088$  a statisticky se neliší od nuly. Konstanta  $b$  regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu  $1,0031 \pm 0,0028$  a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje správné výsledky.

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. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) má pro obsahy amprolia od 0,1 do 5,0  $\text{mg.kg}^{-1}$  opakovatelnost hodnotu 0,10  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

Reprodukovatelnost metody nebylo možné stanovit bez provedení mezilaboratorních porovnávacích testů.

Při prekoncentraci amprolia na silikagelu byla sledována vhodnost použitého promývacího činidla (eluze interferentů), spotřeba desorpčního činidla a výtěžek extrakce na pevné fázi. K eluci interferentů bylo zvoleno extrakční činidlo. Polarita extrakčního činidla je dostatečná k odstranění interferentů a ani při objemu 15 ml činidla nedochází k desorpci amprolia. Spotřeba desorpčního činidla (mobilní fáze) je patrná z elučního profilu amprolia z pevné fáze (obr. 2). Měřením bylo zjištěno, že k desorpci amprolia postačují 2 ml desorpčního činidla. Vliv matrice a obsahu tuku na desorpci amprolia nebyl dále studován.

### Optimalizace mobilní fáze

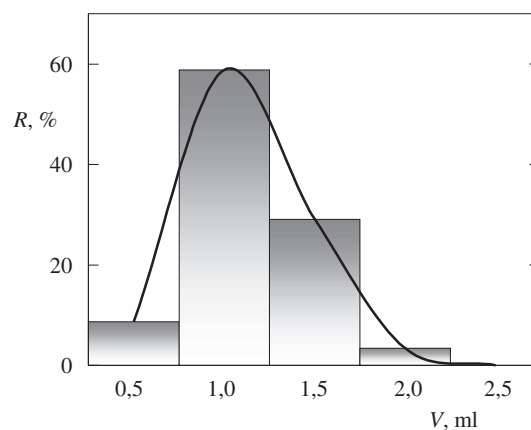
Mobilní fáze byla optimalizována tak, aby retenční faktor byl  $k \geq 2,5$ , počet teoretických pater  $N \geq 5\,000$  a asymetrický faktor  $t_a \leq 1,3$  (obr. 3). Mrtvý retenční objem byl určen jako retenční objem acetonu po odečtení mimokolonových objemových příspěvků. Ve zkoumaných mobilních fázích byl sledován vliv koncentrace acetonitrilu, koncentrace iontového páru (protiiontu) a pH mobilní fáze na retenční faktor.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla  $\phi$  (vyjádřený jako molární zlomek) v mobilní fázi na retenční faktor chromatografované látky  $k$  byl popsán rovnicí<sup>17</sup>:

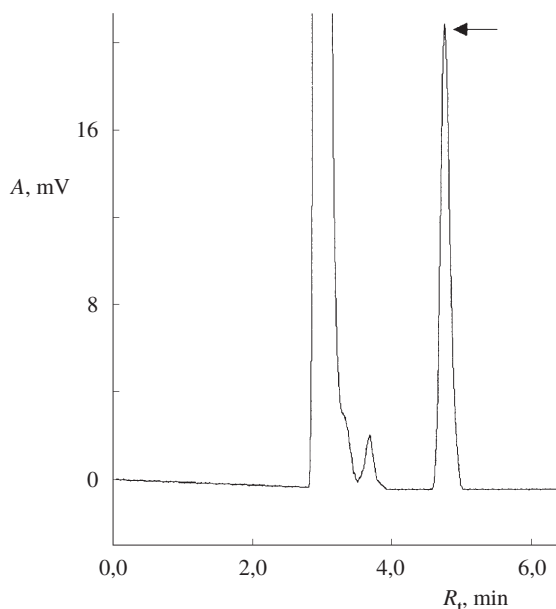
$$k = k_a 10^{-m\phi}$$

kde  $k_a$  je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu získaný extrapolací experimentálních údajů a  $m$  je parametr přímo závislý na síle organického rozpouštědla a povaze rozpouštěné látky. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

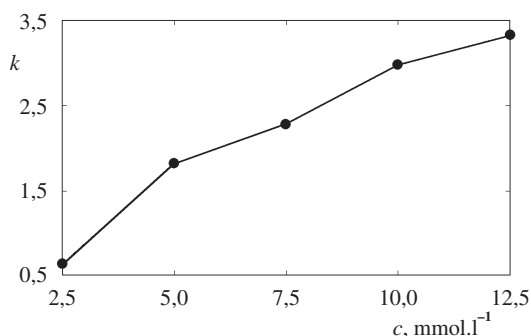
$$\log k = \log k_a - m\phi$$



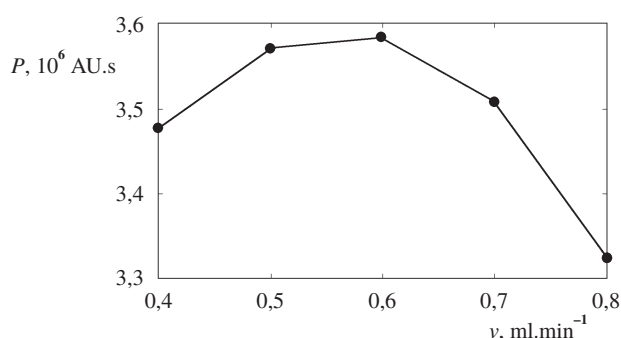
Obr. 2. Eluční profil amprolia na pevné fázi Sep-Pak Silica (výtěžnost  $R$ , objem desorpčního činidla  $V$ )



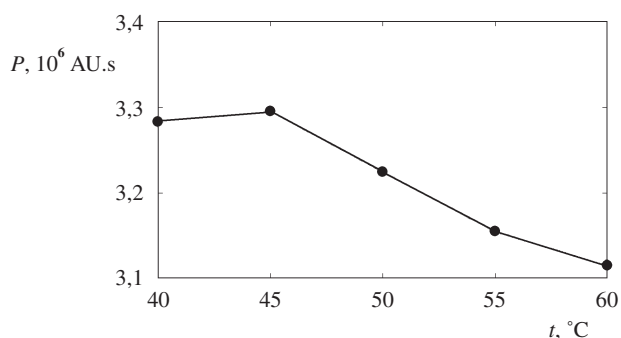
Obr. 3. Separace amprolia na chromatografické koloně SymmetryShield RP<sub>8</sub> ( $4\ \mu\text{m}$ ,  $3,9 \times 150\ \text{mm}$ ) s postkolonovou derivatizací hexakynoželezitanem draselným v prostředí hydroxidu sodného. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce I. Vypočtené eluční charakteristiky: retenční faktor  $k = 2,58$ , asymetrický faktor  $t_a = 1,22$ , počet teoretických pater  $N = 6\,900$



Obr. 4. Vliv koncentrace ( $c$ ) protiiontu sodné soli hexan-1-sulfonové kyseliny v mobilní fázi na retenční faktor ( $k$ ) amprolia



Obr. 5. Vliv průtoku ( $v$ ) derivatizačního činidla na odezvu detektoru vyjádřenou jako plocha ( $P$ ) píku amprolia



Obr. 6. Vliv teploty ( $t$ ) derivatizační smyčky na odezvu detektoru vyjádřenou jako plocha ( $P$ ) píku amprolia

a logaritmy retenčních faktorů se zvyšují s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byla zjištěna lineární závislost mezi koncentrací acetonitrilu (v koncentračním rozmezí  $\varphi = 0,06$  až  $0,1$ ) a logaritmem retenčního faktoru, a rovnice pro mobilní fázi má potom tvar

$$\log k = 0,7736 - 7,1710 \varphi$$

Korelační koeficient  $r = -0,9955$ .

Vliv koncentrace protiiontu na retenční faktor byl sledován pro koncentrace 2,5; 5,0; 7,5; 10 a 12,5 mmol.l<sup>-1</sup> sod-

né soli kyseliny hexan-1-sulfonové v mobilní fázi. Podle předpokladu retence amprolia roste s koncentrací protiiontu (obr. 4). Jako optimální byla zvolena koncentrace protiiontu 7,5 mmol.l<sup>-1</sup>.

Při sledování vlivu pH mobilní fáze na retenční faktor amprolia bylo pH mobilní fáze upraveno vždy triethylaminem nebo kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu. pH mobilní fáze v oblasti 2,5–3,5 nemá vliv na retenci amprolia, pouze dochází ke změně asymetrického faktoru, až ke štěpení píku amprolia.

Teplota separace nebyla optimalizována.

#### Linearity

Neznámé koncentrace byly vyhodnocovány z kalibrační přímky. Při výpočtu hodnot regresních 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 tvar:

$$A = (20\,017 \pm 22\,093) + (2\,124\,383 \pm 10\,257) c$$

kde  $A$  je plocha píku,  $c$  je koncentrace (mg.l<sup>-1</sup>), korelační koeficient  $r = 0,99999$ . Kalibrační přímka je lineární v rozsahu 4,0–40,0  $\mu\text{g}$ .

#### 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.<sup>18</sup>). Byly vypočteny následující hodnoty: mez detekce 0,045 mg.l<sup>-1</sup>, tj. pro daný standardní operační postup 0,030 mg.kg<sup>-1</sup>, a mez stanovitelnosti 0,086 mg.l<sup>-1</sup>, tj. pro daný standardní operační postup 0,060 mg.kg<sup>-1</sup>.

#### Optimalizace derivatizační reakce

Byl sledován vliv průtoku derivatizačního činidla a teploty na odezvu detektoru. Při průtoku mobilní fáze 0,8 ml.min<sup>-1</sup> je optimální průtok derivatizačního činidla 0,6 ml.min<sup>-1</sup> (obr. 5). Optimální teplota derivatizační smyčky je 45 °C, se zvyšující se teplotou odezva detektoru klesá (obr. 6). Vliv koncentrace hexakvanoželezitanu draselného a hydroxidu sodného nebyl studován.

#### Závěr

Metoda HPLC stanovení amprolia v krmivech poskytuje správné a přesné výsledky. Byla stanovena hodnota opakovatelnosti a výtěžnost metody pro koncentrační hladinu amprolia 0,1 až 5 mg.kg<sup>-1</sup>. Metoda je rychlá a celková doba analýzy je asi 90 minut. Pro aplikaci metody v oblasti krmiv byla provedena optimalizace prekoncentrace a preseparace na pevné fázi Silica, a to z důvodu odstranění příslušných interferentů mat-

rice. Vzhledem k použití postkolonové derivatizace a fluorescenční detekce je metoda velmi selektivní.

## LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Szalkowski C. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 48, 285 (1965).
3. Szalkowski C. R., Schultze E. P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 44, 5 (1961).
4. Brügemann J., Schole J.: Landwirtsch. Forsch. 23, 67 (1970).
5. Severjinen M., Buyzen-Satijn A. M.: Analyst 100, 328 (1975).
6. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Cunniff P., ed.), 16. vyd., kap. 5, str. 3. AOAC, Arlington 1995.
7. Davis E. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 129 (1968).
8. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Cunniff P., ed.), 16. vyd., kap. 5, str. 4. AOAC, Arlington 1995.
9. Stolejda J., Růžička B.: Biologiz. Chemiz. Vyz. Zvir. 4, 353 (1968).
10. Cox G. B., Lascombe C. R., Slucutt M. J., Sugden K., Upfield J. A.: J. Chromatogr. 117, 269 (1976).
11. Cox G. B., Sugden K.: Analyst 101, 738 (1976).
12. Kentzer E. J., Cottingham L. S., Smallidge R. L.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 215 (1988).
13. Nagata T., Saeki M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 941 (1986).
14. Wehling R. L., Wetzel D. L.: J. Agric. Food Chem. 32, 1326 (1984).
15. Leeuwen W., Gend van H. W.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 186, 500 (1988).
16. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
17. Berendsen G. E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980).
18. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.

**L. Dudíková<sup>a</sup>, D. Nenáhlová<sup>a</sup>, A. Breburdová<sup>a</sup>, and M. Douša<sup>b</sup>** (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, <sup>a</sup>Prague and <sup>b</sup>Plzeň): **Optimization of the HPLC Method with Postcolumn Derivatization for Determination of Amprolium in Fodders at Contents Lower than 5 mg.kg<sup>-1</sup>**

An HPLC method was developed and validated for rapid determination of amprolium as an undesirable additive to final fodders. Amprolium is extracted from a sample with a mixture of methanol and dichloromethane and, after purification of the extract on a silica gel column, determined by ion-pair reverse-phase chromatography on C8 with fluorescent detection after postcolumn derivatization with potassium hexacyanoferrate (III) in alkaline medium. The separation of amprolium on the C8 reverse phase and its postcolumn derivatization were optimized. The limit of determination was 86 µg.kg<sup>-1</sup>, the repeatability 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> and the yield of the method was 102±5.5 % at amprolium concentrations 0.5–5 mg.kg<sup>-1</sup>. The repeatability was determined on real samples of final fodders.

### Zavedená farmaceutická firma

([www.interpharma-praha.com](http://www.interpharma-praha.com))

zabývající se výrobou API a vývojem vlastních produktů hledá do oddělení jištění jakosti (QA)

### absolventy VŠ (SŠ)

na pozici inspektora QA a registračního pracovníka. Zkušenosti s kontrolou výrobní dokumentace, znalost tvorby DMF předností. Angličtina nezbytná, praxe v oboru vítána. Nástup možný ihned.

Žádosti s profesním životopisem zašlete na adresu:

Interpharma Praha, a.s., Komořanská 955, 143 10 Praha 12, fax 02/41 77 32 35, e-mail: [interpharma@interpharma-praha.cz](mailto:interpharma@interpharma-praha.cz)