

STANOVENÍ DIMETRIDAZOLU VE FINÁLNÍCH KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU HPLC S UV DETEKČÍ. MEZILABORATORNÍ POROVNÁVACÍ ZKOUŠKA METODY

MICHAL DOUŠA

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno; Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň

Došlo dne 23.VIII.1999

Klíčová slova: HPLC, dimetridazol, krmivo

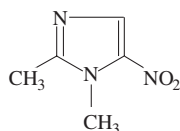
Úvod

Dimetridazol, derivát nitroimidazolu (obr. 1), se používá jako chemoterapeutikum v krmivech pro krůty v dávce 90 mg.kg⁻¹ finálního krmiva¹ k prevenci a terapii histomoníazy. Jeho příprava, struktura a aktivita byly již popsány²⁻⁶.

Pro stanovení dimetridazolu byla vyvinuta řada metod. Jednoduchá kolorimetrická metoda stanovení dimetridazolu v krmivech⁷ byla doporučena sdružením Association of Official Analytical Chemists jako metoda oficiální⁸, přestože metoda stanovení je rušena řadou dalších látek, které jsou přítomny v krmivech. Vzhledem k přítomnosti funkční nitroskupiny v molekule dimetridazolu byly aplikovány rovněž polarografické metody^{9,10}, které byly modifikovány řadou autorů s detekčním limitem od 0,05 mg.kg⁻¹ (cit.¹¹) do 2,0 mg.kg⁻¹ (cit.¹²). Polarografická metoda pak byla rovněž doporučena Analytical Methods Committee jako jedna z nejlepších metod stanovení dimetridazolu v krmivech¹³. Pro stanovení dimetridazolu v krmivech v koncentračním rozsahu 20 až 200 mg.kg⁻¹ byla také popsána metoda plynové chromatografie¹⁴.

Jako alternativní metoda k polarografickým metodám se jeví metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Metoda HPLC vyvinuta Buizerem a Severijnenem¹⁵ vyžaduje příliš dlouhou celkovou dobu analýzy, zejména co se týče vlastní přípravy extraktu, která vyžaduje reextrakci dimetridazolu z vodně-methanolickeho roztoku do chloroformu a vlastní chromatografická separace se provádí na normální fázi Silica za použití mobilní fáze chloroform-methanol s UV detekcí. Jones a spolupracovníci vyvinuly jednoduchou metodu stanovení HPLC po extrakci zkušebního vzorku směsným rozpouštědlem acetonitril-voda přímou analýzou na reverzní fázi s UV detekcí. Bohužel dochází k interferencím furazolidonu a 3,5-dinitro-*o*-toluamidu, které se mohou kombinovat společně s dávkovaným dimetridazolem¹⁶.

Řada publikovaných prací se soustřeďuje především na



Obr. 1. Strukturální vzorec dimetridazolu

stanovení dimetridazolu a jeho hlavního metabolitu – 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazolu¹⁰ a to především ve zvířecích tkáních, plazmě a výkalech. Stanovení dimetridazolu a jeho metabolitu v prasečích tkáních s elektrochemickou detekcí publikoval Carignan a spolupracovníci¹⁷. Výhodou elektrochemické detekce je velmi nízká mez detekce, která se pohybuje kolem 0,1 µg.kg⁻¹. Stanovení dimetridazolu a hydroxydimetridazolu v mase metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí při 318 nm s použitím dvou interních standardů (2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethanol a 1-ethyl-2-methyl-5-nitroimidazol) publikovali Rychener a spolupracovníci¹⁸. Vzhledem k matici vzorku se používá složitě přečištěný ethylacetátového extraktu a to reextrakcí do 0,25 mol.l⁻¹ HCl a po úpravě pH opětovnou extrakcí do dichlormethanu, odpaření k suchu a rozpuštění ve vodném roztoku 50 % methanolu. V případě pozitivních nálezů je pak obsah dimetridazolu potvrzen metodou GC-MS. Metodu stanovení ipronidazolu, ronidazolu a dimetridazolu a jejich metabolitů vedle sebe ve vajíčkách, plazmě a výkalech publikoval Aerts a spolupracovníci¹⁹. Přečištění vodného extraktu se provádí na kolonách Extrelut (Merck, Darmstadt, SRN), následnou elucí isooktanem a převedením do mobilní fáze, vlastní separace se provádí na reverzní fázi C₁₈ s UV detekcí při 313 nm.

Experimentální část

Princip metody

Dimetridazol se stanoví po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem methanol-voda a přečištěním extraktu na pevné fázi (v krmných směsích) resp. jeho nařazením na požadovanou koncentraci (premixy doplňkových látek), metodou RP-HPLC na C₁₈ s UV detekcí při vlnové délce 309 nm.

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepače LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika) a přečištění extraktu bylo provedeno na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Alumina B (Waters, Milford, USA). Kapalinový chromatograf sestával z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), spektrofotometrického detektoru W486 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Byla použita chromatografická kolona NovaPak C₁₈, 4 µm, 3,9×150 mm (Waters, Milford, USA).

Chemikálie

Methanol a acetonitril byly čistoty HPLC grade (J. T. Baker, USA).

Mobilní fáze byla připravena smísením 300 ml acetonitrilu a 700 ml demineralizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA).

Kalibrační roztoky o koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg.l⁻¹ byly připravené postupným ředěním základního roztoku dimetridazolu v methanolu (Riedel-deHaën, SRN) o koncentraci 200 mg.l⁻¹ extrakčním roztokem methanol-voda, který byl připraven smísením 100 ml demineralizované vody a 900 ml methanolu.

Způsob měření (standardní operační procedura)

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a mletí. 5 až 20 g zkušební vzorku podle obsahu dimetridazolu se extrahuje 100 ml extrakčního roztoku methanol–voda 30 minut v 250 ml kónické baňce na laboratorní třepačce.

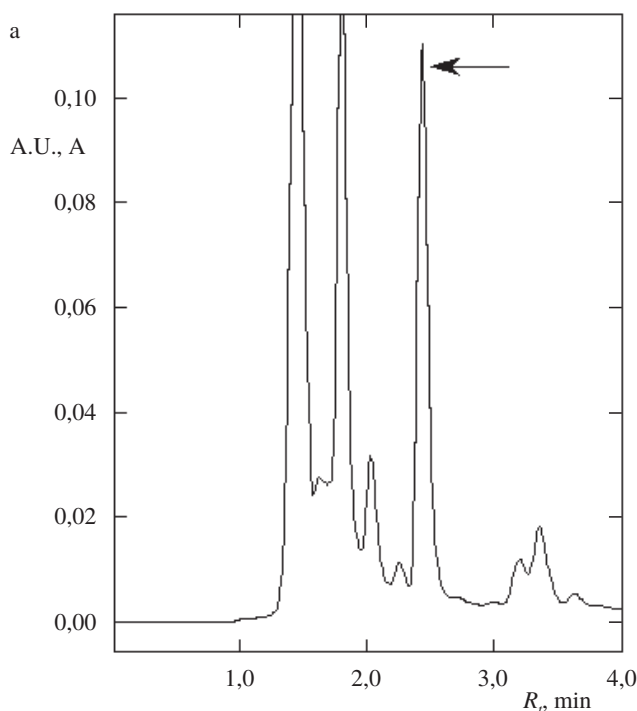
Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi alumina B. Kolonka se připojí k polyethylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 4 ml přefiltrovaného extraktu, na kolonku se nanese asi 1 ml extraktu a kolonka se nechá 5 sekund kondicionovat. Pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou, přičemž první podíl eluátu (asi 0,2 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu (takto přečištěný eluát je nutné promíchat).

Při analýze premixu doplňkových látek se extrakt pouze naředí extrakčním roztokem na koncentraci asi 20 mg.l⁻¹.

HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm, 3,9×150 mm
Průtok mobilní fáze	0,7 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	okolí
Detektor UV	309 nm
Objem nástřiku	10 μl



Výsledky a diskuse

Výběr vzorků

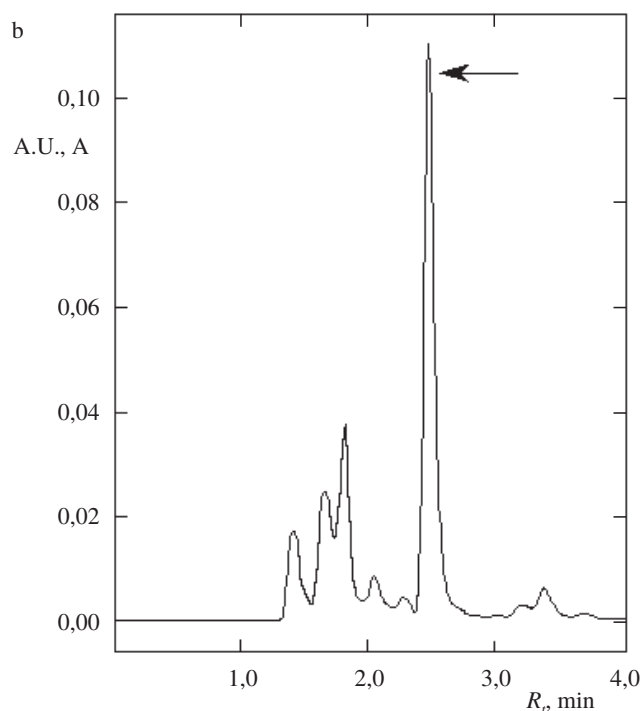
Na analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí odebraných v rámci státního kontroly, zákon o krmivech podle²⁰ §16 a §17.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla vypočtena z kalibračního modelu, kdy mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez (1-α)%ního 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 hodnotě²¹ 0,1. Mez detekce má hodnotu 0,4 mg.l⁻¹, tj. pro danou standardní operační proceduru 1,9 mg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,6 mg.l⁻¹, tj. pro danou standardní operační proceduru 2,9 mg.kg⁻¹.

Robustnost metody – vliv matrice vzorku

Vliv matrice vzorku jsme prokazovali proměřením kalibračních roztoků připravených s matricí vzorku (obr. 2a) a po přečištění matrice (obr. 2b) na pevné fázi Alumina B. Testováním Studentovým t-testem koeficientů regresní rovnice *b* (s matricí vzorku) proti *b'* (po přečištění matrice vzorku) je vypočtená hodnota *t* = 14,758. Porovnáním *t* ≥ *t*(*P* = 0,95; *f* = 3) dospějeme k závěru, že tento rozdíl je statisticky významný. Byl prokázán vliv matrice vzorku a je vždy nutné provést přečištění matrice na pevné fázi.



Obr. 2. Vliv matrice vzorku na separaci dimetridazolu: a – bez přečištění matrice, b – přečištění matrice na pevné fázi Alumina B; reverzní fáze C₁₈, 4 μm, 3,9×150 mm, UV detekce: 309 nm, mobilní fáze – acetonitril + voda (300+700, V+V), průtok: 0,7 ml.min⁻¹, objem nástřiku: 10 μl

Správnost a přesnost

Vzhledem k tomu, že neexistují certifikované referenční materiály byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva (40 % pšenice, 30 % ječmen, 10 % sojový extrahovaný šrot, 10 % masokostní moučka, 5 % úsušky píce a 5 % vápenec) s přídávkem dimetridazolu o koncentrační hladině 50, 100, 150 a 210 mg.kg⁻¹ a pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát jako vzorek krmné směsi. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 50 až 210 mg.kg⁻¹ je (99,0±1,2) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty jako závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu $-0,208 \pm 4,827$ a statisticky se neliší od nuly, konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $0,9993 \pm 0,0335$ a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje správné výsledky.

Dále byly připraveny modelové vzorky krmiva (50 % pšenice, 10 % ječmen a 40 % vápenec) s přídávkem dimetridazolu o koncentrační hladině 1 000, 5 000, 15 000 a 31 000 mg.kg⁻¹ a pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát jako vzorek premixu doplňkových látek. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce III. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 1000 až 31000 mg.kg⁻¹ je (99,2±0,4) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty jako závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu $-9,096 \pm 110,6$ a statisticky se neliší od nuly, konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $0,9929 \pm 0,006$ 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 omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků. Celkový počet vzorků, který byl použit k výpočtu, je 92 a po vyloučení odlehklých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 20 až 190 mg.kg⁻¹ má opakovatelnost hodnotu 4,0 mg.kg⁻¹.

Reprodukovatelnost metody byla stanovena mezilaboratorním porovnávacím testem.

Mezilaboratorní kruhový test

Mezilaboratorního kruhového testu (stanovení dimetridazolu v premixech) se zúčastnilo 14 laboratoří za podmínek normy International Organization for Standardization ISO 5725-1986 (cit.²²) a bylo provedeno vyhodnocení ukazatele opakovatelnosti a reprodukovatelnosti dané metody. Ke statistickému testování odlehlosti hodnot byl použit Cochranův jednostranný test odlehlosti a Grubbsův test v kombinaci s tímto postupem:

Tabulka II

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

Očekávaná hodnota [mg.kg ⁻¹]	52,0	105	157	210
Nalezená hodnota [mg.kg ⁻¹]	52,8	104	156	211
Výtěžek metody [%]	100,7	99,1	99,4	100,2
Interval spolehlivosti	8,7	3,6	5,2	1,9
Relativní směrodatná odchylka [%]	3,50	1,43	2,10	0,76

Tabulka III

Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky premixů

Očekávaná hodnota [mg.kg ⁻¹]	1 030	5 100	15 500	31 100
Nalezená hodnota [mg.kg ⁻¹]	1 025	5 057	15 440	30 870
Výtěžek metody [%]	99,5	98,9	99,1	99,3
Interval spolehlivosti	1,2	1,5	1,4	2,3
Relativní směrodatná odchylka [%]	0,48	0,62	0,55	0,93

Tabulka IV

Výsledky mezilaboratorního testu – premix P1

Laboratoř	Opakování 1	Opakování 2	Průměr
7	26 201	25 425	25 813 ^{*,a}
6	25 640	26 465	26 053 ^{*,a}
1	26 675	27 165	26 920
2	26 915	27 097	27 006
4	27 798	26 714	27 256
11	26 992	27 530	27 261
5	27 625	27 350	27 488
14	28 352	27 262	27 807
15	27 975	27 657	27 816
9	28 070	28 227	28 149
12	27 874	28 876	28 375
10	28 642	28 826	28 734
3	28 439	29 075	28 757
8	28 929	28 680	28 805
Průměrná hodnota [mg.kg ⁻¹]			27 864
Počet neodlehklých laboratoří			12
Odhad směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r			439
Odhad směrodatné odchylky reprodukovatelnosti s_R			760
Ukazatel opakovatelnosti r			1 230
Ukazatel reprodukovatelnosti R			2 127

^a Bližší vysvětlení v textu

- je-li $P > 5 \%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu menší než její pětiprocentní kritická hodnota, považuje se testovaná hodnota za správnou,
- je-li $5 \% \geq P > 1 \%$, tj. leží-li testovaná charakteristika mezi jedno- a pětiprocentní kritickou hodnotou, nazve

se testovaná hodnota hodnotou vybočující a označí se jednou hvězdičkou *.

Tabulka V
Výsledky mezilaboratorního testu – premix P2

Laboratoř	Opakování 1	Opakování 2	Průměr
7	15 891	15 571	15 731 ^{*,a}
1	16 475	15 825	16 150 ^{*,a}
14	16 456	16 302	16 379 ^{*,a}
9	16 418	17 109	16 764
5	16 335	17 250	16 793
2	16 933	16 844	16 889
15	16 949	17 222	17 086
11	17 109	17 082	17 096
6	17 154	17 042	17 098
12	17 535	17 083	17 309
10	17 047	17 826	17 437
8	17 812	17 485	17 649
4	17 757	17 617	17 687
3	18 089	19 239	18 664 ^{*,a}
Průměrná hodnota [mg.kg ⁻¹]			17 180
Počet neodlehých laboratoří			10
Odhad směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r			343
Odhad směrodatné odchylky reprodukovatelnosti s_R			411
Ukazatel opakovatelnosti r			959
Ukazatel reprodukovatelnosti R			1 150

^a Bližší vysvětlení v textu

Tabulka VI
Výsledky mezilaboratorního testu – premix P3

Laboratoř	Opakování 1	Opakování 2	Průměr
7	24 850	24 172	24 511 ^{**,a}
5	26 574	26 370	26 472
12	26 671	26 813	26 742
8	26 684	26 888	26 786
4	27 673	26 630	27 152
6	27 080	27 518	27 299
9	27 496	27 387	27 442
10	28 113	28 035	28 074
2	28 261	28 093	28 177
1	28 425	28 225	28 325
11	28 408	28 727	28 568
15	29 398	28 219	28 809
3	30 652	31 417	31 035 ^{*,a}
14	34 294	34 238	34 266 ^{**,a}
Průměrná hodnota [mg.kg ⁻¹]			27 622
Počet neodlehých laboratoří			11
Odhad směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r			367
Odhad směrodatné odchylky reprodukovatelnosti s_R			845
Ukazatel opakovatelnosti r			1 027
Ukazatel reprodukovatelnosti R			2 365

^a Bližší vysvětlení v textu

– je-li $P \leq 1 \%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu větší než její jednoprocenní kritická hodnota, nazve se testovaná hodnota hodnotou odlehlou a označuje se dvěma hvězdičkami **.

Jako vzorky byly použity komerčně vyráběné premixy na dvou koncentračních hladinách (cca 18 000 a 28 000 mg.kg⁻¹), které byly homogenizovány a na vzorcích byl proveden test homogenity.

Výsledky jsou sestaveny do tabulek IV až VI. Z výsledků mezilaboratorního testu je zřejmé, že ukazatel opakovatelnosti stanovení dimetridazolu metodou HPLC pro premixy při obsahu 17 000 a 28 000 mg.kg⁻¹ dosahuje hodnoty 5 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 7–9 % relativních.

Závěr

Metoda stanovení dimetridazolu v krmivech poskytuje správné a přesné výsledky. Byla stanovena hodnota opakovatelnosti a výtěžnost metody pro koncentrační hladinu dimetridazolu 50 až 31 000 mg.kg⁻¹. Pro aplikaci metody v oblasti krmiv byla provedena optimalizace přečištění extraktu na pevné fázi Alumina B z hlediska odstranění příslušných interferentů matrice, které mají vliv na separaci dimetridazolu na základní linii, a to z důvodu přesné kvantifikace.

LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Grant G. B.: Fed. Regist. 51, 45244 (1986).
3. Voogd C. E., Van der Stel J. J., Jacobs J. J. A. A.: Mutat. Res. 26, 483 (1974).
4. Cohen S. M., Ertruk E., Von Esch A. M., Crovetti A. J., Bryan G. T.: J. Nat. Cancer Inst. 51, 403 (1973).
5. Lucas J. M. S.: Vet. Rec. 73, 4465 (1961).
6. Lucas J. M. S.: Vet. Rec. 74, 759 (1962).
7. Stone L. R., Hobson D. L.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57, 343 (1974).
8. AOAC, v knize: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Horwitz W., ed.), vyd. 13., str. 702. AOAC, Washington DC, 1980.
9. Kane P. O.: J. Polarogr. Soc. 8, 58 (1961).
10. Law G. L., Mansfield G. P., Muggleton D. F., Parnell E. W.: Nature (London) 196, 1224 (1963).
11. Condren H. B., Davies R. E., Deyoe C. W., Zavala M. A., Creger C. R., Couch J. R.: Poultr. Sci. 42, 585 (1963).
12. Allen P. C., McLoughlin D. K.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 55, 1159 (1972).
13. Analytical Methods Committee: Analyst 96, 746 (1971).
14. Di Simone L., Ponti F., Settini G., Martillotti F.: Farmaco, Ed. Prat. 36, 440 (1981).
15. Buizer F. G., Severijnen M.: Analyst 96, 854 (1975).
16. Jones A. D., Burns I. W., Sellings S. G.: Analyst 104, 265 (1979).
17. Carignan G., Macintosh A.I., Skakum W., Sved S.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1146 (1988).

18. Rychener M., Mooser A. E., Koch H.: Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 82, 141 (1991).
19. Aerts R. M., Egberink I. M., Kan C. A., Keukens H. J., Beek W. M. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 46 (1991).
20. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech.
21. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
22. ČSN 01 0251 (ISO 5725-1986): *Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované zkušební metody pomocí mezilaboratorních zkoušek*. ÚNM, Praha 1988.

M. Douša (*Cenure Institute Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional Laboratory, Plzeň*): **Determination of Dimetridazol in Animal Feedingstuffs and Additive**

Premixes by HPLC with UV Detection. Interlaboratory Comparison Test of the Method

An HPLC method of determination of dimetridazol in premixes of additives and feedingstuffs was developed. Dimetridazol is extracted from a fodder sample with aqueous methanol and, after purification of the extract on Sep-Pak Alumina B, it is determined by HPLC on C18 reverse phase with UV detection at 309 nm. The determination limit is 2.9 mg.kg⁻¹, repeatability for the 20–190 mg.kg⁻¹ contents is 4.0 mg.kg⁻¹ and the yield of the method is 99 %. From interlaboratory cyclic tests of determination of dimetridazol in premixes at the 17–28 g.kg⁻¹ contents, the repeatability index was calculated reaching 5 rel. % and the reproducibility index ranging from 7 to 9 rel. %.