

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ OBSAHU LASALOCIDU V KRMIVECH METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ PRO OBSAHY MENŠÍ NEŽ 5 mg/kg

MICHAL DOUŠA

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

Došlo dne 18. XI.1999

Klíčová slova: HPLC, lasalocid, krmivo

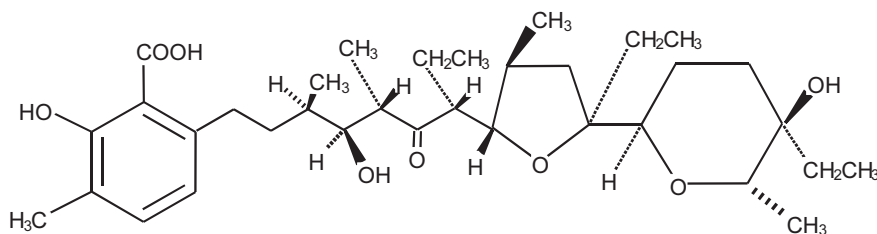
Úvod

Lasalocid (obr. 1), ionoforní polyetherická monokarboxylová kyselina, se používá jako účinné antikokcidikum ve výkrmu kuřat a krůtat a odchovu kuřic a bažantů řádově v obsazích 75 až 125 mg/kg finálního krmiva¹ a ochranná lhůta je 5 dnů. Jeho objev², struktura³⁻⁵ a aktivita^{6,7} jako antikokcidika byly již popsány.

Jako oficiální metoda zkoušení v České republice i v členských státech Evropské unie se dosud používá difuzní plotnová metoda na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (cit.⁸). Obdobnou oficiální metodou je metoda sdružení Association of Official Analytical Chemists⁹ (AOAC). Spektrofluorimetrická metoda stanovení lasalocidu v krmivech je rovněž metodou AOAC¹⁰, která je relativně rychlá a poskytuje reprodukovatelné výsledky i přes složitou matici a řadu používaných čistících kroků extraktu v této metodě. Lasalocid je extrahován octanem ethylnatým v přítomnosti acátového pufru o pH 4,7 a takto získaný extrakt je přečištěn extrakcí s kyselinou chlorovodíkovou a následně s hydroxidem sodným. Korekce pozadí se provádí převedením lasalocidu do komplexu kyselina boritá–lasalocid, přičemž dochází k posunutí maxima emisního spektra k nižším vlnovým délkám z 430 nm na 419 nm a současně dochází k hypochromnímu efektu¹¹. Vlivem přidavku hydroxidu sodného během přípravy vzorku dochází k retroaldolovému štěpení lasalocidu³ a v závislosti na množství hydroxidu klesá rychle výtěžnost metody.

Stanovení lasalocidu v premixech a krmných směsích metodou HPLC s fluorescenční detekcí je poprvé popsáno v metodě¹², která je velmi rychlá a mez detekce se pohybuje od 3 do 15 mg/kg v závislosti na matici vzorku, kdy významnou úlohu hraje vliv přítomných karotenoidů. Lasalocid je extrahován mobilní fází a separace lasalocidu probíhá na reverzní fázi. Výsledky jsou v dobré shodě s metodou spektrofotometrickou¹⁰. HPLC metoda výhodně spojuje selektivitu separačního procesu s velmi selektivní a citlivou detekcí. Dále byla popsána řada prací stanovení lasalocidu v různých zvířecích tkáních a krvi¹³⁻¹⁶, kdy tyto publikace vycházely z již zveřejněné práce¹², byla však nutná modifikace extrakce lasalocidu ze vzorku (ethyl-acetát/acetonitril) a dále pak separace na chromatografické koloně na silikagelu tak, aby vzhledem k jiné matici vzorku docházelo k separaci píku lasalocidu na základní linii. Výtěžnost metody¹³ dosahuje v závislosti na obsahu lasalocidu pouhých 30 % až 90 %; u metody¹⁶ se mez detekce pohybuje kolem 25 µg/kg a výtěžnost metody okolo 70 % pro obsahy lasalocidu 25 µg/kg až 1 mg/kg. Metoda HPLC stanovení lasalocidu s postkolonovou derivatizací¹⁷, která využívá derivatizační reakce hydroxyskupiny molekuly polyetherových monokarboxylových kyselin s aromatickým aldehydem (vanilinem) v prostředí kyseliny sírové při teplotě 95 °C za vzniku barevného aduktu. Metoda umožňuje stanovení monensinu, salinomycinu, narasinu a lasalocidu vedle sebe. Předností metody je zanedbatelný vliv matrice vzorku a poměrně vysoká selektivita detekce; nevýhodou je malá citlivost metody a vysoká mez stanovitelnosti. Derivatizační reakce karboxylové funkční skupiny molekuly lasalocidu byly využity i při předkolonové derivatizaci a následném stanovení metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Jako činidla se používají 1-(bromacetyl)pyren v acetonitrilu v alkalickém prostředí triethylaminu za přítomnosti katalyzátoru kryptofixu K-222 (cit.¹⁸) nebo 9-anthryldiazomethan¹⁹. Nevýhodou obou uvedených metod je velká experimentální náročnost, celková doba analýzy a nízká reprodukovatelnost výsledků. Derivatizace karboxylové skupiny 1-(bromacetyl)pyrenem¹⁸ vyžaduje dvojí přečištění extraktu na silikagelu – jednak přečištění extraktu před vlastní derivatizací a následně i vlastní derivátu. Derivatizace 9-anthryldiazomethanem¹⁹ naopak vyžaduje acetylaci lasalocidu ještě před vlastní derivatizační reakcí.

Na základě požadavků zákona o krmivech §7 (cit.²⁰) Ministerstvo zemědělství České republiky ukládá monitorování výskytu nežádoucích doplňkových látek u výrobků uváděných do oběhu. V souladu s koncepcí pro monitorování nežádou-



Obr. 1. Strukturální vzorec lasalocidu

cích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která umožňuje stanovení lasalocidu ve stopových koncentracích a zároveň snižuje pravděpodobnost interference matrice.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika) a přečištění extraktu bylo provedeno na separační jednotce BAKER spe 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica (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 skládá z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), fluorescenčního detektoru W474 (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 na pH-metru pH 526 (WTW, SRN).

Chemikálie

Methanol, dichlormethan, kyselina octová byly čistoty pro HPLC (J.T. Baker, USA); hexan a octan ethylnatý čistoty p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika); ostatní chemikálie čistoty pro analýzy (Merck, SRN).

Extrakční směs byla připravena smísením 200 ml octanu ethylnatého a 800 ml hexanu. Promývací činidlo pro extrakci na silikagelu bylo připraveno smísením 8 ml acetonu a 192 ml dichlormethanu. Eluční činidlo pro extrakci na silikagelu bylo připraveno smísením 12 ml methanolu a 188 ml dichlormethanu.

Mobilní fáze byla připravena smísením 200 ml octanového pufru o pH 4,0 s 800 ml methanolu. Octanový pufr byl připraven rozpuštěním 3,402 g trihydrátu octanu sodného v deionizované vodě (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA), přidáním 5,0 ml kyseliny octové a doplněním na 1 litr. pH tohoto roztoku bylo upraveno kyselinou fosforečnou na hodnotu pH 4,0.

Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg.l⁻¹ byly připraveny postupným ředěním základního roztoku lasalocidu (Riedel-deHaën, SRN) v methanolu o koncentraci 200 mg.l⁻¹ mobilní fázi.

Výběr vzorků

Pro analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17 (cit.²⁰).

Pracovní postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. 45 g

zkušební vzorku se extrahuje 150 ml extrakční směsí 30 minut v 500 ml kónické baňce na laboratorní třepačce. Na kolonku Spe-Pak Plus Silica, kondicionovanou 4 ml dichlormethanu, se odměří 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Kolonka se promyje 3 krát 3 ml promývacího činidla a lasalocid se eluuje 8 ml elučního činidla do vialky na 10 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku do sucha při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze, promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 8 000 ot.min⁻¹ a nanáší na chromatografickou kolonu. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm, 3,9×150 mm
Složení mobilní fáze	methanol–octanový pufr pH 4,0 (800+200)
Průtok mobilní fáze	1 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	okolí
Objem nástřiku	10 μl
Detektor fluorescenční	excitační vlnová délka: 310 nm, emisní vlnová délka: 430 nm

Výsledky a diskuse

Mez detekce a mez stanovitelnosti

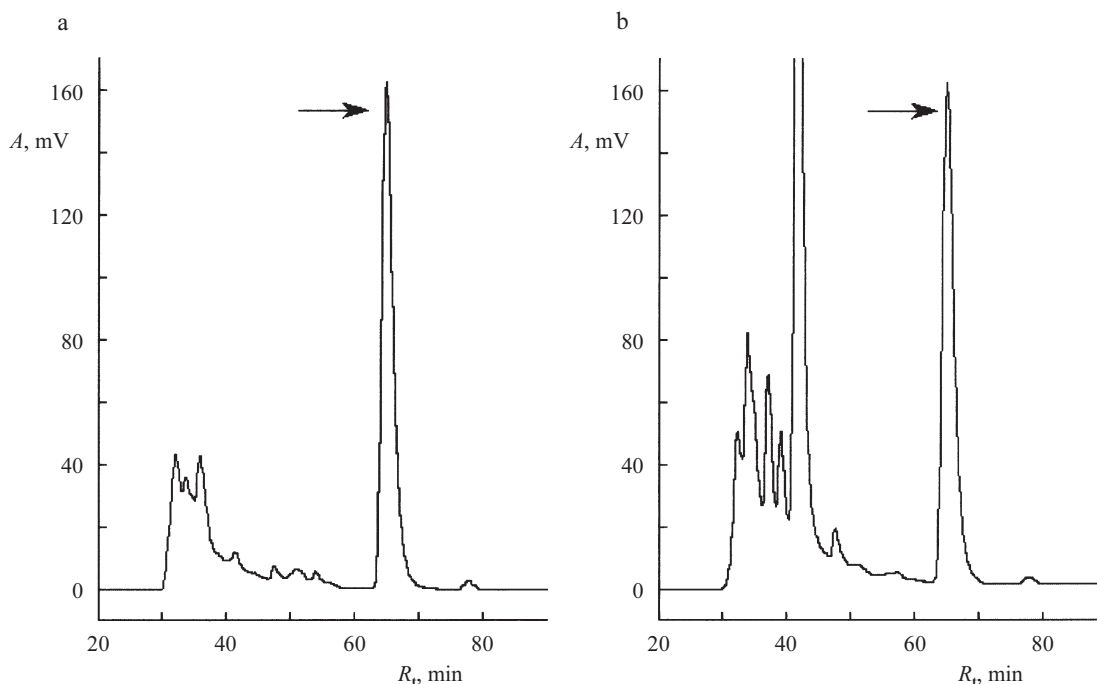
Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez (1-α)%ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle rovná hodnotě 0,1 (cit.²¹). Mez detekce má hodnotu 0,04 mg.l⁻¹, tj. pro standardní operační proceduru 30 μg.kg⁻¹ a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,08 mg.l⁻¹, tj. pro standardní operační proceduru 50 μg.kg⁻¹.

Správnost a přesnost

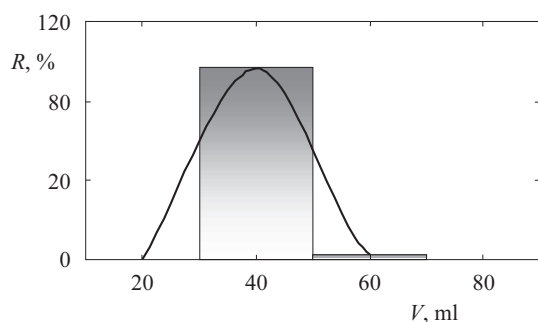
Při prekoncentraci lasalocidu na silikagelu byla sledována vhodnost použitého promývacího činidla (eluce interferentů), potřeba desorpčního činidla a výtěžek extrakce na pevné fázi.

K eluci interferentů byly zvoleny dva promývací systémy – dichlormethan a promývací činidlo dichlormethan–aceton (192+8). Při použití dichlormethanu byly odstraněny pouze látky s nižší polaritou než samotný lasalocid (s největší pravděpodobností přírodní barviva). Při použití druhého promývacího systému byly odstraněny látky s vyšší polaritou současně s barvivy a lipidy. Rozdíl v použitých promývacích systémech je patrný z chromatogramů na obr. 2.

Spotřeba desorpčního činidla je patrná z elučního profilu lasalocidu z pevné fáze Silica (obr. 3). Měření bylo zjištěno, že k desorpci lasalocidu postačuje 6 ml elučního činidla, přesto byl však zvolen objem 8 ml a to z důvodu dokonalé desorpce



Obr. 2. HPLC separace lasalocidu po předchozí prekoncentraci na kolonce Sep-Pak Silica při použití promývacího činidla dichlormethan-aceton (192+8) (a) a dichlormethanu (b); HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I



Obr. 3. Eluční profil lasalocidu z kolonky Sep Pak Silica (výtěžnost R , objem desorpčního činidla V)

Tabulka II

Výtěžek metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg/kg]	0,50	1,00	2,50	5,00
Nalezená hodnota [mg/kg]	0,48	0,92	2,43	4,79
Výtěžek metody [%]	96,4	91,6	97,2	95,8
Interval spolehlivosti	0,01	0,01	0,03	0,11
Relativní směrodatná odchylka [%]	1,66	1,20	0,92	1,92

a kvantifikace lasalocidu a proměnlivosti matrice. Vliv matrice na desorpci lasalocidu nebyl dále studován.

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 obsahem lasalocidu 0,5, 1,0, 2,5 a 5,0 mg/kg. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát. 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 mg/kg je $(95,0 \pm 3,6)$ %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu $-0,0131 \pm 0,1162$ a statisticky se neliší od nuly. Konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $0,9647 \pm 0,0408$ a neliší se statisticky od jedničky. Metoda tudíž 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 35. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 0,2 až 5,0 mg/kg má opakovatelnost hodnotu 0,10 mg/kg.

LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Berger J., Rachlin A. I., Scott W. E., Sternbach L. H., Goldberg M.: J. Am. Chem. Soc. 73, 5295 (1951).

3. Westley J. M., Evans R. H., Williams T., Stempel A.: J. Chem. Soc. D 1970, 71.
4. Johnson S. M., Herrin J., Liu S. H., Paul J.: J. Am. Chem. Soc. 92, 4428 (1970).
5. Westley J. W., Oliveto E. P., Berger J., Evans R. H., Glass R., Stempel A., Toome V., Williams T.: J. Med. Chem. 16, 397 (1973).
6. Mitrovic M., Schildknecht E. E.: 62nd Annual Meeting of Poultry Science Association South Dakota State University, Brookings, SD, Aug. 6–10. 1973.
7. Bartley E. E., Herod E. L., Bechtle R. M., Sapienza D. A., Brent B. E.: J. Anim. Sci. 49, 1066 (1979).
8. Vyhláška č. 222/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchování vzorků podléhajících zkáze, ve znění pozdějších předpisů.
9. Official Methods of Analysis, 16th Ed., AOAC, secs. 5.3.10, Method 975.60. Arlington, 1995.
10. Official Methods of Analysis, 16th Ed., AOAC, secs. 5.2.04, Method 975.61. Arlington, 1995.
11. MacDonald A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1214 (1978).
12. Osadca M., Araujo M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61, 1074 (1978).
13. Weiss G., Kaykaty M.: J. Agric. Food Chem. 31, 81 (1983).
14. Weiss G., Kaykaty M., Miwa B.: J. Agric. Food Chem. 31, 78 (1983).
15. Frank L. R., Barnes C. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, 4, 584 (1989).
16. Weiss G., Felicito N. R., Kaykaty M., Chen G., Caruso A., Hargroves E., Crowley C., MacDonald A.: J. Agric. Food Chem. 31, 75 (1983).
17. Johannsen F. H.: Agribiol. Res. 44, 78 (1991).
18. Asukabe H., Murata H., Harada K., Suzuki M., Oka H., Ikai Y.: J. Agric. Food Chem. 42, 112 (1994).
19. Martinez E. E., Shimoda W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 637 (1986).
20. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech.
21. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači. FINISH, Pardubice 1992.

M. Douša (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional Laboratory Department, Plzeň): **Determination of Lasalocid in Amino Feeds by Fluorescence Detection for Contents Lower than 5 mg/kg**

An HPLC method of determination of lasalocid was developed for fast monitoring of its content as an undesirable additive in final fodders. Lasalocid is extracted from a sample with a mixed solvent ethyl acetate–hexane and, after purification of the extract with silica gel, it is determined by HPLC on a reverse C₁₈ phase with fluorescence detection. The determination limit (50 µg/kg), repeatability (0.1 mg.kg⁻¹) and yield of the method (95 %) were found for lasalocid concentrations 0.5–5 mg/kg. The repeatability was determined for real samples of final fodders.

Česká společnost chemická přijme

novou výkonnou redaktorku Chemických listů

Kvalifikační předpoklady: VŠ vzdělání chemického zaměření
Předpokládaný nástup: jaro 2001, několikaměsíční zaškolení
Bližší informace: prof. B. Kratochvíl, tel. 02/3113908, 0606/870366, e-mail: kratochb@vscht.cz
 Ing. C. Jirátová, tel. 02/21082370, e-mail: jiratova@csvts.cz
 Ing. M. Bláhová, tel. 02/22220184, e-mail: mblahova@csvts.cz