

## HPLC STANOVENÍ ROBENIDINU V KRMIVECH

MICHAL DOUŠA

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno,  
Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20,  
317 60 Plzeň  
hplc@seznam.cz

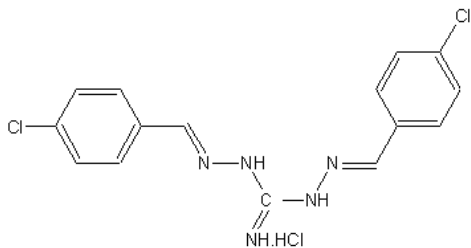
Došlo 18.7.03, přepracováno 15.4.04, přijato 25.6.04.

Klíčová slova: HPLC, robenidin, krmivo

### Úvod

Robenidin (obr. 1), 1,5-bis-(4-chlorbenzyliden)karbonimidohydrazid, se v současné době používá jako účinné antikokcidikum ve výkrmu kuřat a krůťat i odchovu kuřic a bažantů v obsazích 30 až 66 mg kg<sup>-1</sup> finálního krmiva<sup>1</sup> a jeho ochranná lhůta činí 5 dnů. Jeho aktivita jako antikokcidika byla již popsána<sup>2</sup>.

Ke stanovení obsahu robenidinu v krmivech se používají metody spektrofotometrické nebo chromatografické. Spektrofotometrické stanovení robenidinu je založeno na rozdílu absorbcí v kyselém a alkalickém prostředí po předchozím přečištění extraktu sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém<sup>3,4</sup>. Dnes se používají především metody HPLC. Automatizovanou HPLC metodu stanovení robenidinu publikovali Zagar a spol.<sup>5</sup> Autoři používají mobilní fázi methanol – octová kyselina – dichlormethan (90 : 10 : 900) při průtoku 1 ml min<sup>-1</sup> stacionární fázi silikagel a UV detekci při 280 nm. Extrakce robenidinu je uskutečňována dvěma způsoby: manuálně methanolem (po naředění roztokem kyselina octová – dichlormethan 10 : 990 je vzorek analyzován) a automaticky pomocí extrakční jednotky SolidPrep II spojené on-line s chromatografickým systémem. Nevýhodou metody je nízká citlivost použité UV detekce při vlnové délce 280 nm. Vhodnější vlnová délka je 352 nm (cit.<sup>6</sup>). Po extrakci robenidinu chloroformem a převedení do acetonitrilu se extrakt analyzuje na reverzní fázi C18 za použití mobilní fáze acetonitril – voda



Obr. 1. Strukturální vzorec robenidinu

– 25 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (72,5 : 22,5 : 5) o průtoku 1,5 ml min<sup>-1</sup> a UV detekce při 352 nm. Dále byla popsána citlivější HPLC metoda stanovení robenidinu s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci robenidinu dansylchloridem. Vzniklý derivát je separován na silikagelu za použití mobilní fáze chloroform – hexan – tetrahydrofuran – methanol (50 : 50 : 2 : 1) při průtoku 2 ml min<sup>-1</sup> a fluorescenční detekce při 485 nm s excitační vlnovou délkou 320 nm (cit.<sup>7</sup>). Mez detekce je 0,4 mg l<sup>-1</sup> (8 ng při objemu nástřiku 20 µl).

Na základě požadavků zákona o krmivech §7 (cit.<sup>8</sup>) Ministerstvo zemědělství České republiky ukládá monitorování výskytu nežádoucích doplňkových látek, mezi které robenidin patří, u výrobků krmiv uváděných do oběhu. V souladu s koncepcí pro monitorování nežádoucích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která by byla dostatečně selektivní a citlivá pro koncentrační hladiny robenidinu řádově v mg kg<sup>-1</sup>.

### Experimentální část

#### Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika) a přečištění extraktu na separační jednotce Baker SPE 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica (Waters, Milford, USA). K zakoncentrování extraktů se používal koncentrátor vzorků Termovap (Ecom, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla uskutečněna na kapalinovém chromatografu, který se skládal ze dvou vysokotlakých čerpadel W515, z nichž jedno bylo použito k postkolonové derivatizaci, autosampleru W717 Plus Autosampler, spektrofotometrického detektoru W486 (vše Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Derivatizační smyčka RXN 1000 Coil Kit byla umístěna do termostatu Column Temperature Control System (vše Waters, Milford, USA) a byla zařazena mezi chromatografickou kolonu a detektor pomocí směšovací komůrky Mixer Cartridge 50 ml (Supelco, USA). Byla používána kolona XTerra RP18, 4 µm, 3,0 × 150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoků bylo měřeno na pH-metru pH 526 (WTW, SRN) s kombinovanou skleněnou elektrodou a pH-metr byl kalibrován na ftalátový pufr CertiPUR pH 4,01 a borátový pufr pH 9,18 (Merck, SRN).

#### Chemikálie

Methanol, dichlormethan a acetonitril (vše HPLC grade; J.T. Baker, USA) sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové (98+ %; Sigma-Aldrich, USA), triethylamin (p.a.; Fluka, Švýcarsko), ethylacetát a hydroxid sodný (p.a.; Lachema Neratovice, Česká republika). Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), kyselina chlorovodíková a kyselina fosforečná (vše čistoty UltraPure; Merck, SRN).

Extrakční roztok byl připraven smísením 200 ml ethylesteru kyseliny octové a 800 ml dichlormethanu. K extrakci na tuhé fázi bylo použito promývací činidlo o složení ethylacetát – dichlormethan (10:90, V/V), a eluční činidlo o složení methanol – dichlormethan (12:88, V/V).

Derivatizační roztok k postkolonové derivatizaci byl připraven rozpuštěním 30,0 g hydroxidu sodného v 1000 ml vody.

Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg l<sup>-1</sup> byly připraveny postupným ředěním základního roztoku robenidinu (Röthel, SRN) v methanolu o koncentraci 50 mg l<sup>-1</sup> mobilní fázi.

#### V ý b ě r v z o r k ů

Analýzy byly prováděny na reálných vzorcích finálních krmiv odebraných v rámci státního odborného dozoru (zákon o krmivech<sup>8</sup> §16 a §17) a na připravených modelových vzorcích krmiv o složení: 45 % pšenice, 15 % ječmen, 12 % sojový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % krevní šrot, 5 % úsušky picnin, 5 % pšeničné klíčky mačkané, 4 % vápenec a 1 % premix minerálních látek a vitaminů s přídavkem robenidinu o koncentrační hladině 0,4; 0,8; 1,6; 4,0 a 8,0 mg kg<sup>-1</sup>. Dále byly připraveny modelové vzorky robenidinu o koncentracích 2 a 4 mg kg<sup>-1</sup> naředěním a homogenizací krmné směsi pro brojlery o obsahu robenidinu 60 mg kg<sup>-1</sup> (Doagra a.s., Domažlice) pšeničnou krmnou moukou. Tyto připravené vzorky byly použity k mezilaboratorním porovnávacím zkouškám.

#### P r a c o v n í p o s t u p

Všechny vzorky 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 min v 500 ml kónické baňce na laboratorní třepače a pak 2 min na ultrazvukové lázni. Takto

Tabulka I

Složení optimalizovaných mobilních fází

Složení	Mobilní fáze		
	I	II	III
Methanol, ml	660	–	–
Acetonitril, ml	–	640	420
Voda, ml	334	360	574
Kyselina fosforečná, ml	4	–	4
Triethylamin, ml	2	–	2
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, g	–	2,180	–
Natrium-hexan-1-sulfonát, g	1,8822	–	1,8822
pH	3,5 <sup>a</sup>	9,0 <sup>b</sup>	3,5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>pH upraveno triethylaminem, <sup>b</sup>pH upraveno kyselinou chlorovodíkovou

získaný extrakt se přečistí na silikagelu.

#### P ř e č i š t ě n í e x t r a k t u a v l a s t n í s e p a r a c e

Na kolonku Sep-Pak Plus Silica, kondicionovanou 4 ml promývacího činidla, se odměří 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Kolonka se promyje dvakrát 3 ml promývacího činidla a robenidin se eluuje 8 ml elučního činidla do vialky na 10 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku k suchu při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze I (viz tabulka I) na ultrazvukové lázni (1 min), promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 ot min<sup>-1</sup> a 10 µl extraktu se dávkuje na temperovanou (35 °C) chromatografickou kolonu při průtoku mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup> a UV detekci 314 nm. Složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce I.

#### V ý s l e d k y a d i s k u s e

##### O p t i m a l i z a c e p ř e d b ě ž n ě s e p a r a c e e x t r a k t u n a t u h ě f á z i

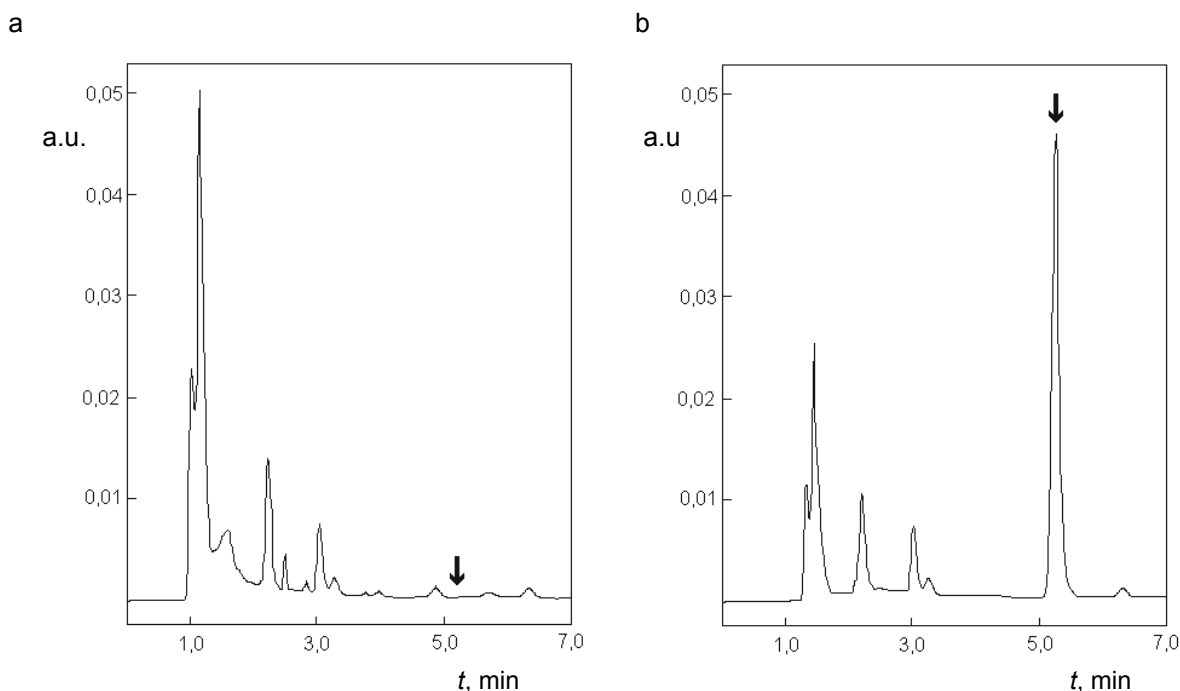
K eluci interferentů ze silikagelu byly zvoleny dva promývací systémy: dichlormethan – ethylacetát (80 : 20) a dichlormethan – ethylacetát (90 : 10). Desorpce robenidinu byla sledována na modelovém roztoku robenidinu v extrakčním roztoku při takové koncentraci, která odpovídala 8 mg kg<sup>-1</sup> robenidinu ve finálním krmivu. Při použití promývacího činidla dichlormethan – ethylacetát (80 : 20) se robenidin desorboval již od 8 ml proteklého činidla, při použití promývacího činidla dichlormethan – ethylacetát (90 : 10) se však nedesorboval ani při použití 15 ml činidla, a proto byl zvolen tento promývací systém. Měřením bylo zjištěno, že k desorpci robenidinu postačují 4 ml elučního činidla. Při optimalizaci separace na tuhé fázi byl sledován vliv obsahu tuku v krmivu tak, že se k modelovém roztoku robenidinu přidal roztok kafilerního tuku, který odpovídal obsahu tuku 20 a 80 g kg<sup>-1</sup> ve finálním krmivu. Se zvyšujícím se obsahem tuku stoupá spotřeba desorpčního činidla nutná ke kvantitativní desorpci robenidinu až na 5 ml činidla, proto byl zvolen objem 8 ml zaručující dokonalou desorpci a kvantifikaci.

Tabulka II

Separční charakteristiky robenidinu pro optimalizované mobilní fáze

Mobilní fáze <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> [min] <sup>b</sup>	<i>k</i> <sup>c</sup>	<i>n</i> <sup>d</sup>	<i>A<sub>S</sub></i> <sup>e</sup>
I	5,76	3,12	6 100	1,00
II	4,30	2,07	6 300	1,09
III	4,17	2,01	5 500	1,33

<sup>a</sup> Složení viz tab. I; <sup>b</sup> *t<sub>R</sub>* – retenční čas; <sup>c</sup> *k* – retenční faktor; <sup>d</sup> *n* – počet teoretických pater; <sup>e</sup> *A<sub>S</sub>* – asymetrický faktor



Obr. 2. Chromatogram robenidinu; a – slepý pokus modelového vzorku bez přidavku robenidinu, b – modelový vzorek (koncentrace robenidinu 4,0 mg kg<sup>-1</sup>); HPLC podmínky jsou uvedeny v textu; mobilní fáze I (viz tab. I)

#### Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byly optimalizovány tak, aby retenční faktor byl  $k \geq 2,0$ , počet teoretických pater  $n \geq 5000$  a asymetrický faktor  $A_s \leq 1,4$  (chromatogram je uveden na obr. 2). Vypočtené separační charakteristiky u všech tří mobilní fází jsou uvedeny v tabulce II. Vždy byl sledován vliv objemové frakce organického rozpouštědla a u mobilní fáze I vliv koncentrace protiiontu a teploty na retenční faktor.

Vliv objemové frakce organického rozpouštědla  $\varphi$  v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky  $k$  byl popsán rovnicí<sup>9</sup>:

$$\log k = \log k_a - m\varphi \quad (1)$$

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 solventu a povaze solutu. Experimentálně byly zjištěny lineární závislosti mezi objemovou frakcí rozpouštědla a logaritmem retenčního faktoru a vypočtené parametry jsou uvedeny v tabulce III.

Vliv koncentrace protiiontu na retenční faktor byl sledován pro látkové množství 2,5; 5,0; 7,5; 10 a 12,5 mmol l<sup>-1</sup> sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové v mobilní fázi. Podle předpokladu retence robenidinu roste s koncentrací protiiontu (obr. 3). Jako optimální byla zvolena koncentrace 10 mmol l<sup>-1</sup>, kdy se retence mění nejméně.

Retence solutu s rostoucí teplotou klesá a  $\log k$  je

#### Tabulka III

Vypočtené parametry závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku organického rozpouštědla v mobilní fázi

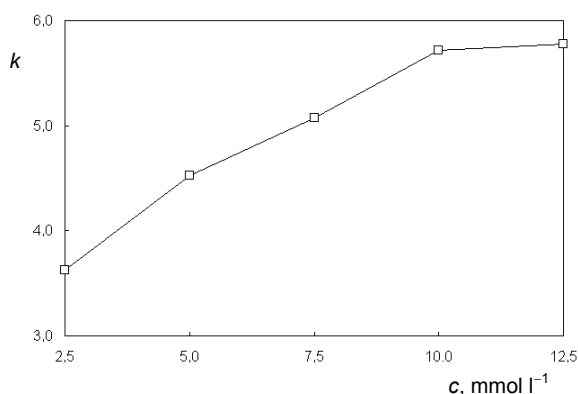
Mobilní fáze <sup>a</sup>	objemový zlomek $\varphi$ <sup>b</sup>	$k_a$ <sup>c</sup>	$-m$ <sup>d</sup>	$r$ <sup>e</sup>
I	0,55–0,75	19 230	5,79	-0,9989
II	0,55–0,70	498,1	3,80	-0,9995
III	0,35–0,50	3 615	7,23	-0,9980

<sup>a</sup> Složení viz tab. I; <sup>b</sup>  $\varphi$  – objemový zlomek organického rozpouštědla v mobilní fázi; <sup>c</sup>  $k_a$  – retenční faktor v čisté vodě jako mobilní fázi; <sup>d</sup>  $m$  – směrnice závislosti  $\log k$  na  $\varphi$ ; <sup>e</sup>  $r$  – korelační koeficient závislosti  $\log k$  na  $\varphi$

lineární funkcí převrácené hodnoty teploty  $T$ . Tento závěr odpovídá obecnému tvaru van't Hoffových závislostí pro chromatografický proces<sup>10,11</sup>:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} = A + \frac{B}{T} \quad (2)$$

kde  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  jsou standardní entalpie a standardní entropie solutu v daném chromatografickém systému,  $R$  je plynová konstanta a  $A$ ,  $B$  jsou konstanty závislé na chromatografickém systému. Experimentální závislosti jsou v dobré



Obr. 3. Závislost retenčního faktoru robenidinu  $k$  na koncentraci protiiontu sodné soli hexan-1-sulfonové kyseliny  $c$  v mobilní fázi

shodě s těmito závěry a pro rovnici (2) byly vypočteny konstanty  $A = -6,2639$  a  $B = 2397,0$  s korelačním koeficientem  $r = 0,9983$ .

S přihlédnutím k získaným výsledkům byla zvolena jako optimální mobilní fáze I.

#### De t e k c e

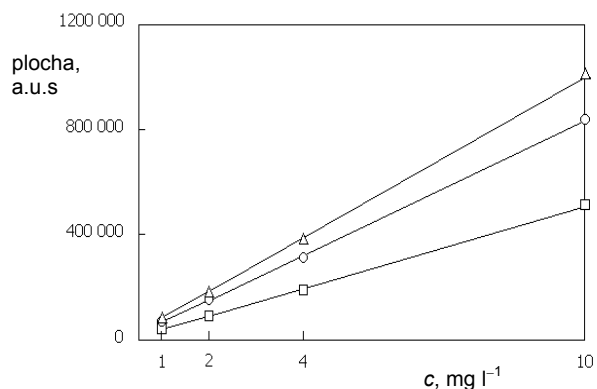
Na absorpční spektrum robenidinu má vliv pH prostředí. V kyselém prostředí je absorpční maximum 314 nm, se stoupajícím pH se maximum batochromně posouvá na 347–348 nm, v silně alkalickém prostředí hydroxidu sodného pak vzniká barevný produkt s maximem absorpce při 464 nm (cit.<sup>4</sup>). Tento fakt byl využit ke zvýšení selektivity detekce. Reakce s hydroxidem sodným byla provedena za kolonou a optimální podmínky jsou uvedeny v tabulce IV. Při derivatizační reakci za kolonou byla optimalizována teplota, průtok derivatizačního činidla a koncentrace hydroxidu sodného.

Dále bylo zjištěno, že teplota v rozmezí 20–70 °C nemá vliv na odezvu detektoru vyjádřenou jako směrnice

Tabulka IV

Podmínky pro postkolonovou derivatizaci hydroxidem sodným

Parametr	Hodnota
Kolona	XTerra RP18, 4 $\mu\text{m}$ , 3,0 $\times$ 150 mm
Průtok mobilní fáze	0,8 ml min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze	mobilní fáze II
Průtok derivatizačního činidla	0,4 ml min <sup>-1</sup>
Objem derivatizační smyčky	1000 $\mu\text{l}$
Teplota derivatizační smyčky	laboratorní
Teplota kolony	35 °C
Objem nástřiku	50 $\mu\text{l}$
Detektor UV	406 nm



Obr. 4. Vliv koncentrace hydroxidu sodného na kalibrační přímky po postkolonové derivatizaci; □ 0,25 M-NaOH, ○ 0,50 M-NaOH, △ 0,75 M-NaOH

Tabulka V

Vliv průtoku derivatizačního činidla na kalibrační závislosti

Průtok derivatizačního činidla [ml min <sup>-1</sup> ]	$A^a$	$B^b$	$r^c$
0,2	-8037	91 700	0,9999
0,4	-6350	93 900	0,9999
0,6	-1230	86 460	0,9999
1,0	-11 110	77 220	0,9999

Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tab. IV; <sup>a</sup>  $A$  – směrnice kalibrační závislosti ( $\mu\text{V s mg}^{-1}\text{ l}$ ); <sup>b</sup>  $B$  – úsek kalibrační závislosti ( $\mu\text{V s}$ ); <sup>c</sup>  $r$  – korelační koeficient

kalibrační přímky.

Při průtoku derivatizačního činidla 0,4 ml min<sup>-1</sup> je směrnice kalibrační přímky nejvyšší, se zvyšujícím se průtokem klesá (viz tabulka V).

Dále bylo zjištěno, že citlivost detekce stoupá se zvyšující se koncentrací hydroxidu sodného (obr. 4).

#### P ř e s n o s t a s h o d n o s t

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné certifikované referenční materiály, byla přesnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou nebo přijatou referenční hodnotou) ověřena analýzou modelových vzorků. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován pětkrát. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti  $p = 0,95$ ) jsou uvedeny v tabulce VI. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 0,4 až 8,0 mg kg<sup>-1</sup> je  $(101,2 \pm 6,5)\%$ . Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány lineární regresí. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta  $a$  regresního vztahu (konstantní odchylka) má hodnotu  $0,0411 \pm 0,3373$  a statisticky se neliší od nuly.

Tabulka VI

Statistické hodnocení HPLC stanovení robenidinu v modelových vzorcích krmných směsí ( $n = 5$ )

Statistické parametry					
Očekávaná hodnota, mg kg <sup>-1</sup>	0,40	0,80	1,60	3,95	7,96
Nalezená hodnota, mg kg <sup>-1</sup>	0,41	0,78	1,59	4,23	7,87
Výtěžek metody, %	100,7	97,8	99,3	107,1	98,9
Interval spolehlivosti, %	3,1	1,5	2,4	1,1	1,1
Relativní směrodatná odchylka, %	0,25	1,66	0,25	1,21	1,14

Konstanta  $b$  regresního vztahu (proporcionální odchylka) má hodnotu  $0,9976 \pm 0,0832$  a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje přesné výsledky.

Shodnost 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 krmiv, jejichž celkový počet byl 15. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) má opakovatelnost pro obsahy 0,40 až 4,50 mg kg<sup>-1</sup> hodnotu 0,09 mg kg<sup>-1</sup>.

Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Reprodukovatelnost metody byla stanovena mezilaboratorní porovnávací zkouškou. Mezilaboratorní porovnávací zkoušky se zúčastnilo 7 laboratoří za podmínek

normy ISO 5725–1986 (cit.<sup>12</sup>) 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:

- 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 jednoprocenní a pětiprocentní kritickou hodnotou, označí se testovaná hodnota jako odlehlá
- je-li  $p \leq 1\%$ , tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu větší než její jednoprocenní kritická hodnota, označí se testovaná hodnota jako odlehlá.

Tabulka VII

Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky

Laboratoř	Vzorek	
	1 1 mg kg <sup>-1</sup>	2 4 mg kg <sup>-1</sup>
F	1,91 <sup>a</sup>	3,08
G	1,42	3,14
D	1,33	3,22
E	1,16	3,74
C	1,54	4,06
B	1,55	4,24
A	1,45	4,40
Průměrná hodnota, mg kg <sup>-1</sup>	1,41	3,70
Počet neodlehlých laboratoří	6	7
Směrodatná odchylka opakovatelnosti $s_r$ , mg kg <sup>-1</sup>	0,01	0,06
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti $s_R$ , mg kg <sup>-1</sup>	0,03	0,34
Ukazatel opakovatelnosti $r$ , mg kg <sup>-1</sup>	0,29	0,67
Ukazatel reprodukovatelnosti $R$ , mg kg <sup>-1</sup>	0,46	1,62

<sup>a</sup> Hodnota byla označena jako odlehlá

Jako vzorky byly použity modelové vzorky o koncentraci 1 a 4 mg kg<sup>-1</sup>.

Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky jsou sestaveny do tabulky VII. Je zřejmé, že ukazatel opakovatelnosti stanovení robenidinu metodou HPLC pro obsahy 1 a 4 mg kg<sup>-1</sup> dosahuje hodnoty 18 až 20 % rel. a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 32 až 44 % rel.

#### Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny jako trojnásobek resp. desetinásobek šumu základní linie. Mez detekce má hodnotu 0,13 mg l<sup>-1</sup>, tj. pro pracovní postup 90 µg kg<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti má hodnotu 0,43 mg l<sup>-1</sup>, tj. pro standardní operační postup 0,30 mg kg<sup>-1</sup>.

#### Závěr

Byla vyvinuta HPLC metoda stanovení robenidinu v krmivech pro koncentrace řádu mg kg<sup>-1</sup>. Byla optimalizována předseparace, separace i detekce robenidinu tak, aby chom dostali co nejnižší hodnoty meze stanovitelnosti robenidinu a získané výsledky byly shodné a přesné. Byla stanovena hodnota opakovatelnosti a reprodukovatelnosti metody na základě statistického vyhodnocení mezilaboratorních porovnávacích zkoušek. Metoda je rychlá a celková doba analýzy je asi 90 min.

#### LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Kantor S., Kennett R., Waletzki E.: *Science* 168, 373 (1970).
3. Analytical Methods Committee: *Analyst* 100, 668 (1975).
4. Bories G. F.: *Analyst* 100, 567 (1975).
5. Zagar B. J., Acione P. P., Chrekian G. P.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58, 822 (1975).
6. Ramos F., da Silveira I. N.: *Bol. Fac. Farm. Coimbra* 15, 61 (1991).
7. Cohen H., Armstrong F., Campbell H.: *J. Chromatogr.*, A 694, 407 (1995).
8. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
9. Berendsen G. E., Galan L.: *J. Chromatogr.* 196, 21 (1980).
10. Colin H., Guiochon G.: *J. Chromatogr.* 158, 183 (1978).
11. Jinno K., Ozaki N.: *J. Liq. Chromatogr.* 7, 877 (1984).
12. ČSN 01 0251 (eqv. ISO 5725-1986), Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované zkušební metody pomocí mezilaboratorních zkoušek, ÚNM, Praha 1988.

**M. Douša** (*Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional Laboratory, Plzeň*):  
**HPLC Determination of Robenidine in Feedstuffs**

An HPLC method of determination and fast monitoring of low concentrations of robenidine in feedstuffs was developed. Robenidine is extracted from sample with a dichloromethane – ethyl acetate mixture and, after purification of the extract on a Sep-Pak Silica column, is determined by ion-pair HPLC on C18 reverse phase with UV detection at 314 nm. The preseparation and separation of robenidine were optimized. The limit of determination, repeatability and recovery of the method are 400 µg kg<sup>-1</sup>, 90 µg kg<sup>-1</sup> and 101.2 ± 6.5 %, respectively, at robenidine concentrations 0.4–4.5 mg kg<sup>-1</sup>. In the interlaboratory comparison tests of the method at the 1 and 4 mg kg<sup>-1</sup> levels, the repeatability and reproducibility indexes were calculated, ranging from 18 to 20 % and from 32 to 44 %, respectively.