

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ ETHOPABÁTU V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A FINÁLNÍCH KRMIVECH METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ 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 17.I.2000

Klíčová slova: HPLC, ethopabát, fluorescenční detekce, krmivo

Úvod

Ethopabát (obr. 1), methylester 4-acetamido-2-ethoxy-benzoové kyseliny, se používá v krmivech v kombinaci s amproliem jako prevence proti kokcidióze drůbeže v dávce $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ finálního krmiva¹ a jeho ochranná lhůta činí 3 dny. Jeho příprava, struktura² a jeho aktivita³ jako antikocidika byly již popsány.

Pro stanovení ethopabátu v krmivech bylo popsáno několik metod, které jsou však poměrně zdoluhavé a experimentálně náročné. Szalkowského spektrofotometrická metoda⁴ je velmi časově náročná i když je použitelná v přítomnosti dalších antibiotik nebo stimulatorů růstu, které toto stanovení dále neruší. Metody plynové chromatografie jsou použitelné po předchozí předkolonové derivatizaci ethopabátu^{5,6}. Oficiální metodikou sdružení Association of Official Analytical Chemists (AOAC) je rovněž spektrofotometrická metoda⁷. Autoři po extrakci ethopabátu hydrolyzují amid na volný amin, který je diazotován dusitanem sodným a následně podroben kopulaci s *N*-(1-naftyl)ethylendiaminem za vzniku azoderivátu. Ten je extrahován do butanolu a jeho absorpční maximum je při 555 nm. Schronk a spol.⁸ použili k přečištění matrice kolonovou chromatografii (neutrální oxid hlinitý), k separaci ethopabátu HPLC na reverzní fázi C_{18} a UV detekci při 280 nm.

Následující metoda vychází z již publikované HPLC metody⁸, avšak je modifikována předběžná separace a ke zvýšení selektivity a citlivosti metody je použita fluorimetrická detekce.

Experimentální část

Princip metody

Ethopabát se stanoví po extrakci zkušební vzorku methanolem a přečištění extraktu na bazickém oxidu hlinitém,

metodou HPLC na reverzní fázi C_{18} s fluorimetrickou detekcí při vlnové délce 268 nm (excitační) a 350 nm (emisní).

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 se skládal z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), fluorimetrického detektoru W474 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Jako kolona byla použita chromatografická kolona NovaPak C_{18} , 4 μm , 3,9x150 mm (Waters, Milford, USA).

Chemikálie a pomůcky

Methanol a acetonitril byly čistoty pro HPLC (J. T. Baker, USA). Mobilní fáze byla připravena smísením 300 ml acetonitrilu a 700 ml deionizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA). Kalibrační roztoky o koncentraci 40; 80; 160 a 400 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny postupným ředěním základního roztoku ethopabátu v methanolu (Fluka, Švýcarsko) o koncentraci 200 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ methanolem. Extrakty vzorků byly filtrovány skládaným papírovým filtrem MN 280 $\frac{1}{4}$ (Macherey-Nagel, SRN).

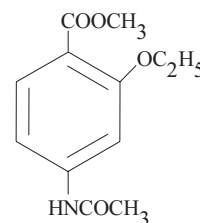
V ý b ě r v z o r k ů

Na analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí a premixů odebraných v rámci státní kontroly, zákon o krmivech podle §16 a §17 (cit.⁹).

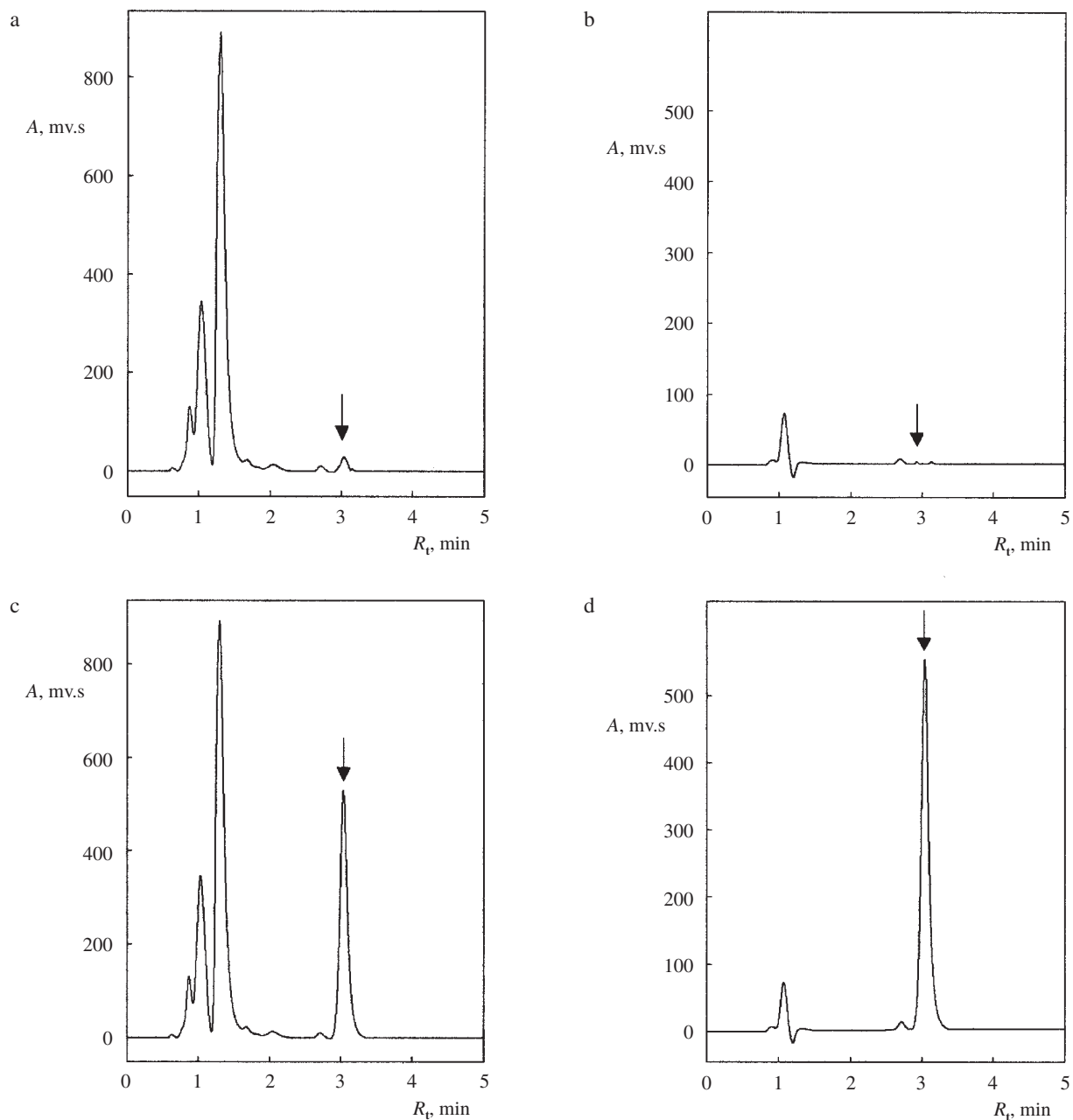
Pracovní postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a mletí. 5 až 25 g zkušební vzorku, podle deklarovaného obsahu ethopabátu, se extrahuje 100 ml methanolu po dobu 30 minut ve 250 ml uzavřené kónické baňce na laboratorní třepače. Po extrakci se extrakt zfiltruje.

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na kolonce Sep-Pak Alumina B po předchozím naředění extraktu na požadovanou koncentraci methanolem. Kolonka



Obr. 1. Strukturální vzorec ethopabátu



Obr. 2. HPLC separace ethopabátu na modelovém vzorku. Slepý pokus bez přečištění matrice a) a po přečištění matrice b), modelový vzorek (koncentrace ethopabátu $5,33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) bez přečištění matrice c) a po přečištění matrice d) na kolonce Sep-Pak Alumina B. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I

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 premixů doplňkových látek se extrakt pouze naředí methanolem na koncentraci asi $80 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Výsledky a diskuse

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 $(1-\alpha)\%$ 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 kalibrač-

Tabulka I
HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm , 3,9 \times 150 mm
Složení mobilní fáze	acetonitril–voda (300 + 700)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml.min ⁻¹
Teplota kolony	okolí
Objem nástřiku	5 μl
Detektor	excitační vlnová délka 268 nm, fluorimetrický emisní vlnová délka 350 nm

Tabulka II

Parametry fluorescenční detekce ethopabátu (excitační vlnová délka/emisní vlnová délka)

Parametr ^a	Fluorescenční detekce	
	268 nm/350 nm	300 nm/350 nm
<i>a</i>	166087	45763
<i>b</i>	19658	8763
<i>r</i>	0,9999	0,9999
X_S	3,2	15,1

^a *a*, *b* – koeficienty regresní rovnice, *r* – korelační koeficient, X_S – mez stanovitelnosti ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

Tabulka III

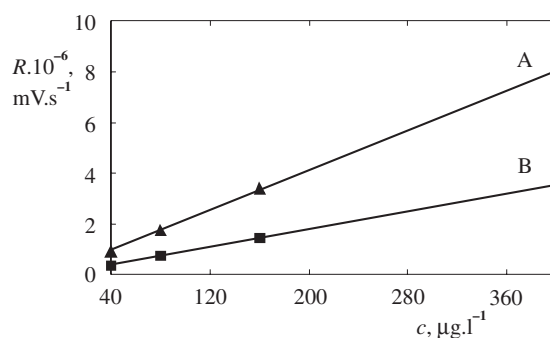
Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí

Statistické parametry	Hodnota			
Očekávaná hodnota [mg.kg^{-1}]	1,33	2,67	5,33	10,67
Nalezená hodnota [mg.kg^{-1}]	1,30	2,64	5,44	10,90
Výtěžek metody [%]	97,7	98,9	102,1	102,2
Interval spolehlivosti [%]	3,0	1,2	0,6	0,8
Relativní směrodatná odchylka [%]	1,85	0,76	0,37	0,52

ního modelu dostatečně malá a obvykle je rovna hodnotě 0,1 (cit.¹⁰). Mez detekce má hodnotu 1,3 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tj. pro daný pracovní postup 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti má hodnotu 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tj. pro daný pracovní postup 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Robustnost metody – vliv matrice vzorku

Vliv matrice vzorku jsme prokazovali jednak proměřením extraktu připraveného modelového vzorku (33 % pšenice, 30 % ječmen, 20 % sojový extrahovaný šrot, 5 % masokostní moučka, 5 % žitné otruby, 4 % vápenec a 3 % úsušky pícnin) bez přídavku ethopabátu za podmínek metody bez přečištění (obr. 2a) a po přečištění extraktu vzorku (obr. 2b) na kolonce Sep-Pak Alumina B (slepy vzorek) a proměřením kalibračních



Obr. 3. Porovnání kalibračních přímek fluorescenční detekce při emisní vlnové délce 350 nm a excitační vlnové délce 268 nm (A) a 300 nm (B)

roztoků připravených bez přečištění (obr. 2c) a po přečištění vzorku (obr. 2d) na kolonce Sep-Pak Alumina B. Testováním Studentovým *t*-testem koeficientů regresní rovnice *b* (bez přečištění) proti *b'* (po přečištění matrice vzorku) je vypočtená hodnota $t = 14,185$. Porovnáním $t \geq t_{\text{krit.}}$ ($P = 0,95$; $f = 3$) dospějeme k závěru, že tento rozdíl je statisticky významný, je vždy nutné provádět přečištění.

Robustnost metody

Parametry fluorescenční detekce jsme sledovali proměřením kalibračních roztoků ethopabátu při emisní vlnové délce 350 nm a dvou různých excitačních vlnových délkách – 268 nm a 300 nm (obr. 3). Výsledky a vypočtené statistické parametry kalibrace (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Kalibrace za těchto podmínek této metody (excitační vlnová délka 268 nm) vykazuje vyšší citlivost a nižší mez stanovitelnosti.

Správnost a přesnost

Vzhledem k tomu, že neexistují certifikované referenční materiály, byla správnost metody (těsnost shody získané hodnoty s jeho hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Byly připraveny modelové vzorky krmiva s přídavkem ethopabátu o koncentrační hladině 1,33; 2,67; 5,33 a 10,67 mg.kg^{-1} a pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 \times jako vzorek krmné směsi. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P = 0,95$) jsou uvedeny v tabulce III. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 1,33 až 10,67 mg.kg^{-1} je (100,2 \pm 3,6) %. 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 $-0,079 \pm 0,117$ a statisticky se neliší od nuly, konstanta *b* regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $1,0297 \pm 0,0191$ 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 omezena na výpočet ukazatele opakovatelnosti. Ukazatel opakovatelnosti byl vypočten ze směrodatné odchyl-

Tabulka IV

Výsledky mezilaboratorního testu. Stanovení ethopabátu metodou HPLC v premixech a krmných směsích

Parametr	Laboratoř	Průměr [mg.kg ⁻¹] ve vzorku			
		P1	P2	S1	S2
	5	2 292	1 443	6,62	5,74
	6	2 333	1 475	6,80	5,65
	8	2 424	1 541	6,95	6,20
	9	2 463	1 448	7,20	6,15
	10	2 335	1 453	8,90**	5,61
	11	2 094	1 376	7,15	5,64
	12	2 123	1 358	7,10	5,25
	15	2 459	1 853**	9,13**	8,01**
Průměrná hodnota [mg.kg ⁻¹]		2 315	1 442	6,97	5,70
Počet neodlehých laboratoř		8	7	6	7
Směrodatná odchylna opakovatelnosti s_r [mg.kg ⁻¹]		44	33	0,33	0,26
Směrodatná odchylna reprodukovatelnosti s_R [mg.kg ⁻¹]		145	65	0,33	0,37
Ukazatel opakovatelnosti r [mg.kg ⁻¹]		122	91	0,93	0,74
Ukazatel reprodukovatelnosti R [mg.kg ⁻¹]		407	183	0,93	1,05

V tabulce jsou uvedeny pouze průměry dvou paralelních stanovení, které jsou k nahlédnutí u autora; další vysvětlení v textu

ky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků pro premixy doplňkových látek i finální krmiva. Celkový počet vzorků pro finální krmiva, který byl použit k výpočtu, je 40 a po vyloučení odlehých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 2,0 až 8,0 mg.kg⁻¹ má ukazatel opakovatelnosti hodnotu 0,63 mg.kg⁻¹. Celkový počet vzorků pro premixy doplňkových látek, který byl použit k výpočtu, je 20 a po vyloučení odlehých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 1200 až 2400 mg.kg⁻¹ má ukazatel opakovatelnosti hodnotu 120 mg.kg⁻¹.

Reprodukovatelnost metody byla stanovena mezilaboratorním porovnávacím testem.

Mezilaboratorní kruhový test

Mezilaboratorního kruhového testu se zúčastnilo 8 laboratoř za podmínek normy ISO 5725–1986 (cit.¹¹) 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 pětiprocenní kritickou hodnotou, nazve se testovaná hodnota hodnotou vybočující a označí se jednou hvězdičkou *),
- 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 – 1 400 a 2 400 mg.kg⁻¹ a na dvou vzorcích finálních krmiv o přibližné koncentraci 8 mg.kg⁻¹. Vzorky byly upraveny mletím, následně byly zhomogenizovány a na vzorcích byl proveden test homogenity (ANOVA).

Výsledky mezilaboratorního kruhového testu jsou sesta-

veny do tabulky IV. Z výsledků mezilaboratorního testu je zřejmé, že ukazatel opakovatelnosti stanovení ethopabátu metodou HPLC pro premixy při obsahu 1 400 a 2 400 mg.kg⁻¹ dosahuje hodnoty 5 až 6 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 12 až 18 % relativních. Ukazatel opakovatelnosti pro finální krmiva dosahuje hodnoty 13 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 13 až 18 % relativních.

Závěr

Metoda stanovení ethopabátu v krmivech poskytuje správné a přesné výsledky. Byla stanovena hodnota ukazatele opakovatelnosti pro koncentrační hladinu ethopabátu 2,0 až 2 400 mg.kg⁻¹, která je 5 až 6 % relativních. Výťažnost metody pro koncentrační hladinu ethopabátu 1,3 až 10,7 mg.kg⁻¹ je (100,2 ± 3,6) %. Byly srovnány hodnoty opakovatelnosti získané pouze v naší laboratoři a hodnoty opakovatelnosti vypočtené z výsledků mezilaboratorního kruhového testu. Obě hodnoty opakovatelnosti jsou v dobré shodě. Pro aplikaci metody stanovení ethopabátu v oblasti krmiv byla provedena optimalizace přečištění extraktu na kolonkách Sep-Pak Alumina B.

LITERATURA

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Grimme P., Schmitz F. P.: Berichte 87, 179 (1954).
3. Rogers D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 488 (1964).
4. Szalkowski C. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 46, 464 (1963).
5. Buhs R. P., Polin D., Beattie J. O., Beck J. L., Smith J. L., Speth O. C., Trenner N. R.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 357 (1966).

6. Handy P. R., Holzer F. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53, 461 (1970).
7. Cunniff P. (ed.): *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, kap. 5, Method 964.29. AOAC, Arlington 1995.
8. Schronk L. R., Colvin B. M., Hanks A. R., Bushway R. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60, 1048 (1977).
9. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech.
10. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači*. FINISH, Pardubice 1992.
11. ČSN 01 0251 (ekv 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): **Determina-**

tion of Ethopabate in Admixture Premixes and in Animal Feeds by HPLC with Fluorescence Detection. Interlaboratory Comparative Test of the Method

An HPLC method of determination of ethopabate for the purpose of rapid monitoring its contents in admixture premixes and in final fodders was developed. Ethopabate is extracted from a sample with methanol and after purification of the extract on basic aluminium oxide it is determined by HPLC on the C18 reverse phase with fluorescence detection. The values of the determination limit ($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), repeatability ($0.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the yield of the method ($100.2\pm 3.6 \%$) were determined in the ethopabate concentration range $1.3\text{--}10.7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The repeatability value was determined with samples of real fodders. From the interlaboratory circular tests of the determination, the repeatability index was calculated, amounting to $5\text{--}6 \%$ at $2\text{--}2400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The reproducibility index ranges between 13 and 18 %.