

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**STANOVENÍ VYBRANÝCH ANTIKOKCIDIK V KUŘECÍM MASE METODAMI QUENCHERS A
HPLC**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Jitka Kydlíčková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní PharmDr. Lucii Chocholoušové Havlíkové, Ph.D. za cenné rady, čas a odborné vedení při sestavování této diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat mé rodině a všem mým blízkým za obrovskou podporu, která pro mne byla velice důležitá po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Dne:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Jitka Kydlíčková

Školitel: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Stanovení vybraných antikokcidik v kuřecím mase metodami QuEChERS a HPLC**

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj metody pro stanovení 5 vybraných antikokcidik – flubendazolu, robenidinu, diclazurilu, toltrazurilu a lasalocidu A v kuřecím mase modifikovanou metodou QuEChERS ve spojení s HPLC a UV detekcí.

Tato práce se zabývá optimalizací chromatografických podmínek – výběrem vhodné stacionární a mobilní fáze a vhodné vlnové délky k UV detekci, dále optimalizací přípravy vzorku pomocí modifikované metody QuEChERS. Zároveň byla na konci práce metoda částečně validována – byla zhodnocena opakovatelnost analýzy, přesnost, správnost, linearita a další parametry.

Pro separaci byla vybrána kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 μm) a jako mobilní fáze byla po sérii experimentů zvolena 0,1% kyselina mravenčí o pH 4 (pH upraveno triethylaminem) s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v).

Nakonec byl proveden test vhodnosti chromatografického systému (SST), zahrnující následující parametry: opakovatelnost analýzy (RSD u opakovatelnosti retenčních časů < 1%, u opakovatelnosti pro plochy píků byla RSD v rozmezí od 0,23% do 1,04%); rozlišení (> 1,5); faktor symetrie (0,8 - 1,5) a účinnost chromatografické kolony pro jednotlivé analyty. Dále byla provedena částečná validace metody, zahrnující parametry: přesnost (RSD v rozmezí 4,80 - 13,27%); správnost (RSD v rozmezí 1,43% - 6,62%); linearitu ($r^2 > 0,99$) a detekční a kvantitativní limity (LOQ = 50 – 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD = 15,15 – 121,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Klíčová slova: flubendazol, robenidin, diclazuril, toltrazuril, lasalocid A, QuEChERS, HPLC, antikokcidika

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Jitka Kydlíčková

Supervisor: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: **The determination of anticoccidials in chicken meat using QuEChERS and HPLC**

This diploma thesis is focused on the development of modified QuEChERS method in conjunction with HPLC and UV detection for the determination of five selected anticoccidials - flubendazole, robenidine, diclazuril, toltrazuril and lasalocid A in chicken meat.

This thesis deals with the optimization of chromatographic conditions - selection of a suitable stationary and mobile phases, and a suitable wavelength for the UV detection and also deals with optimization of sample preparation using the modified QuEChERS method. At the end of the thesis the method has been partially validated - repeatability, precision, accuracy, linearity, and other parameters were evaluated.

For the separation was chosen Ascentis Express Phenyl Hexyl column (4.6 x 100 mm, 2.7 micron), and as the mobile phase after a series of experiments was chosen 0.1% formic acid pH 4 (pH adjusted with triethylamine) with acetonitrile (50:50, v/v).

Finally, the test of suitability of the chromatographic system (SST) was performed and the following parameters were measured: repeatability of the analysis (RSD for reproducibility of retention times of <1%, the repeatability of the peak areas was RSD from 0.23% to 1.04%); resolution (> 1.5); symmetry factor (0.8 - 1.5) and the number of the theoretical plate for each analyte. As a next step a partial validation of the method has been done including: precision (RSD in the range of 4.80 -13.27%); accuracy (RSD in the range of 1.43% - 6.62%); linearity ($r^2 > 0.99$) and detection and quantification limits (LOQ = 50 to 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOD = 15.15 – 121.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Keywords: flubendazole, robenidine, diclazuril, toltrazuril lasalocid, QuEChERS, HPLC, anticoccidials

Obsah

1. ÚVOD	8
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. Stručná charakteristika jednotlivých analytů	13
3.1.1. Robenidin	13
3.1.1.1. Chemická struktura, vlastnosti látky	13
3.1.1.2. Mechanismus účinku a toxicita	13
3.1.2. Lasalocid A sodná sůl	14
3.1.2.1. Chemická struktura, vlastnosti látky	14
3.1.2.2. Mechanismus účinku a toxicita	15
3.1.3. Flubendazol.....	15
3.1.3.1. Chemická struktura, vlastnosti látky	15
3.1.3.2. Mechanismus účinku a toxicita	16
3.1.4. Diclazuril.....	16
3.1.4.1. Chemická struktura, vlastnosti látky	16
3.1.4.2. Mechanismus účinku a toxicita	17
3.1.5. Toltrazuril.....	18
3.1.5.1. Chemická struktura, vlastnosti látky	18
3.1.5.2. Mechanismus účinku a toxicita	18
3.2. Metody hodnocení získané rešerší.....	19
3.2.1. Metody hodnocení pro robenidin	19
3.2.2. Metody hodnocení pro lasalocid A.....	21
3.2.3. Metody hodnocení pro flubendazol	21
3.2.4. Metody hodnocení pro diclazuril.....	22
3.2.5. Metody hodnocení pro toltrazuril	22
3.3. QuEChERS.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1. Přístrojové vybavení použité k experimentu	26
4.2. Použité kolony.....	26
4.3. Chemikálie, sorbenty pro QuEChERS a standardy, biologický materiál, použité mobilní fáze.....	27
4.3.1. Chemikálie.....	27
4.3.2. Sorbenty pro QuEChERS	27
4.3.3. Standardy.....	28
4.3.4. Biologický materiál.....	28

4.3.5.	Použité mobilní fáze.....	28
4.4.	Výsledné podmínky analýzy, příprava zásobních roztoků standardu, standardu a vzorku pro výslednou analýzu	29
4.4.1.	Výsledné podmínky analýzy.....	29
4.4.2.	Příprava zásobních roztoků standardu, standardu a vzorku pro výslednou analýzu	30
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1.	Zjištění výchozích podmínek a optimalizace parametrů.....	33
5.1.1.	Výběr vhodných vlnových délek	33
5.2.	Výběr vhodné mobilní fáze a kolony.....	36
5.3.	Optimalizace přípravy vzorku.....	46
5.3.1.	Výběr vhodné kombinace solí a organického rozpouštědla, vhodného sorbentu k přečištění.....	46
5.4.	Částečná validace metody.....	51
5.4.1.	Test vhodnosti chromatografického systému – SST.....	51
5.4.2.	Částečná validace analytické metody	56
6.	ZÁVĚR.....	65
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	67
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	68

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá stanovením vybraných antikokcidik ve vzorku kuřecích prsou, a to metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s modifikovanou extrakční metodou QuEChERS.

Antikokcidika jsou hojně využívána k léčbě i k profylaxi kuřat, ať už ve formě premixů či přidávaná do napájecí vody. V této diplomové práci bylo k experimentu vybráno 5 antikokcidik:

- Robenidin, jehož mechanismus účinku sestává ze dvou procesů, každý z nich působí na jiná vývojová stadia kokcií. Působí jak kokciostaticky tak kokciocidně [1], [2].
- Lasalocid A (lasalocid), který působí kokciocidně na časná nepohlavní stadia kokcií [1].
- Toltrazuril působí kokciocidně na veškerá stadia kokcií, jak pohlavní tak nepohlavní [2].
- Diclazuril působí degradační změny intracelulárních stadií – při pohlavním i nepohlavním rozmnožování, ale přesný mechanismus účinku není znám [3].
- Flubendazol způsobuje inhibici energetického metabolismu inhibicí syntézy tubulinu [4].

Vzhledem k potenciálně nízké reziduální koncentraci v biologickém vzorku je nutné použití vysoce citlivých metod. Námí vyvinutá metoda umožňuje nejen citlivou kvantitativní analýzu, ale byla vyvinuta pro stanovení většího počtu látek, které je možno analyzovat současně. V této práci se jedná o 5 výše zmíněných látek.

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení vybraných antikokcidik v kuřecím mase za pomoci metody QuEChERS a vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s UV detekcí.

Nejprve bylo nutné nalézt vhodné podmínky pro detekci a dále vybrat vhodné chromatografické podmínky zahrnujících vhodnou stacionární a mobilní fázi, vhodný průtok, teplotu a čas analýzy.

Dále bylo nutné optimalizovat přípravu vzorku pomocí metody QuEChERS a nakonec zhodnotit některé parametry nutné k validaci metody.

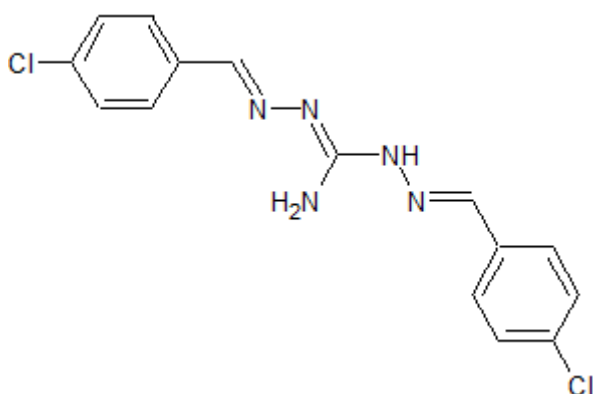
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Stručná charakteristika jednotlivých analytů

3.1.1. Robenidin

Robenidin, systematickým názvem 1,2-bis[(E)-(4-chlorophenyl)methylideneamino]guanidin, také označovaný pod synonymy khimkokside nebo chimcoccide je syntetickým guanidinovým derivátem, používaným nejčastěji k prevenci kokcidiózy způsobené především parazitickými prvky z rodu *Eimeria*, a to u drůbeže, zejména u krocanů a domácích králíků, ale i u člověka [1], [2], [5].

3.1.1.1. Chemická struktura, vlastnosti látky



Obrázek č. 1 - strukturní vzorec robenidinu

Robenidin je světlá až žlutá na světle tmavnoucí krystalická látka. Dobře se rozpouští v dimethylformamidu, chloroformu i dimethylsulfoxidu, v methanolu a ethanolu je rozpustný jen slabě, ve vodě je nerozpustný. Jeho krystaly tají při 289 – 290 °C [1].

3.1.1.2. Mechanismus účinku a toxicita

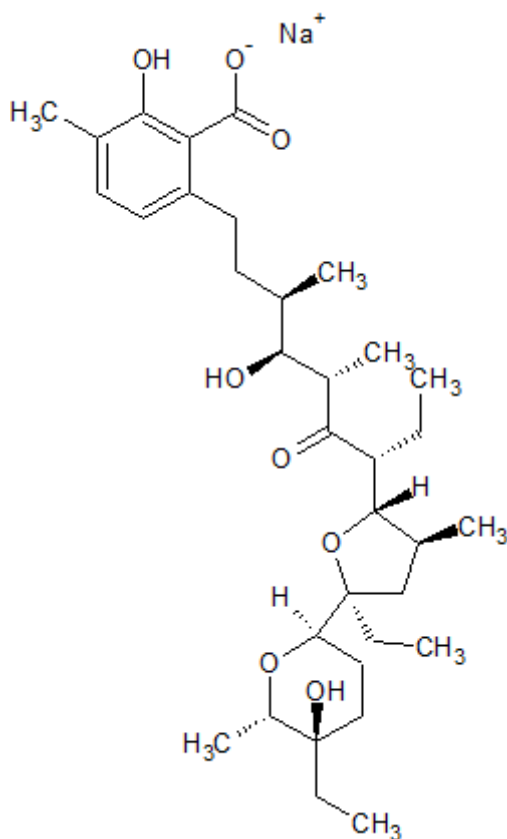
Pro robenidin je charakteristická interakce s energetickým metabolismem buňky kokcií inhibicí fosforylace dýchacího řetězce. Robenidin působí na pohlavní i nepohlavní stadia kokcií, a to jak kokcidiostatickým tak později i kokcidiocidním účinkem [1], [2].

Z hlediska bezpečnosti a toxicity látky jak pro člověka, tak pro exponovaná zvířata byl vyhodnocen jako bezpečné antikokcidikum, nicméně nesmí být podáván nosnicím, neboť i ve vejcích se mohou objevovat jeho stopy [1], [6].

3.1.2. Lasalocid A sodná sůl

Lasalocid, systematickým názvem 6-[(3R,4S,5S,7R)-7-[(2S,3S,5S)-5-ethyl-5-[(2R,5R,6S)-5-ethyl-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]-3-methyloxolan-2-yl]-4-hydroxy-3,5-dimethyl-6-oxononyl]-2-hydroxy-3-methylbenzoát sodný vznikl jako fermentační produkt *Streptomyces lasaliensis* a je nejčastěji používán jako antikokcidikum především u drůbeže a dobytka, kde bývá také často přidáván do krmiva [1], [2], [7], [8].

3.1.2.1. Chemická struktura, vlastnosti látky



Obrázek č. 2 - strukturní vzorec lasalocidu A

Lasalocid je světle hnědá práškovitá, dobře se sypoucí hrubozrnná látka, která taje při 168 – 171 °C. Lasalocid je dobře rozpustný v methanolu a ostatních organických rozpouštědlech, ve vodě se rozpouští pouze slabě [1].

3.1.2.2. *Mechanismus účinku a toxicita*

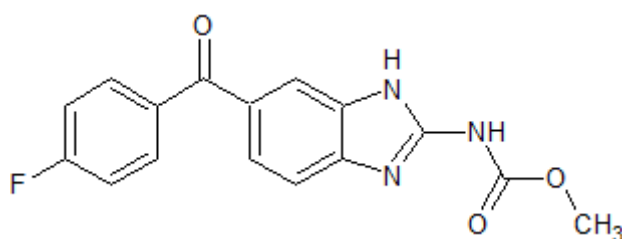
Vzhledem k dobré průchodnosti lasalocidu přes buněčné membrány dochází ke strukturálním změnám u kokcií, které vedou až k jejich destrukci. Nejvyšší účinnost lasalocid vykazuje u časných nepohlavních vývojových stadií kokcií rodu *Eimeria*, u 1. generace trofozoitů a také u nedospělých schizontů [1], [2], [8].

Lasalocid by neměl být podáván koním a koňovitým, stejně tak ani nosnicím, a to z důvodu hromadění ve vejcích a jeho toxicity pro člověka [1], [6], [8].

3.1.3. *Flubendazol*

Flubendazol, systematickým názvem methyl-N-[6-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát, označovaný také pod synonymy flumoxan nebo flubenol, je benzimidazol se širokým spektrem účinku používaný proti infekcím způsobených nematody jak u člověka, tak i u zvířat, především u prasat a drůbeže [2], [4], [9].

3.1.3.1. *Chemická struktura, vlastnosti látky*



Obrázek č. 3 - strukturní vzorec flubendazolu

Flubendazol je bílá krystalická látka tající při teplotě vyšší než 260 °C [9], [10]. Je nerozpustný ve vodě, alkoholu i anorganických kyselinách. Slabě se rozpouští v organických kyselinách a organických rozpouštědlech [11].

3.1.3.2. Mechanismus účinku a toxicita

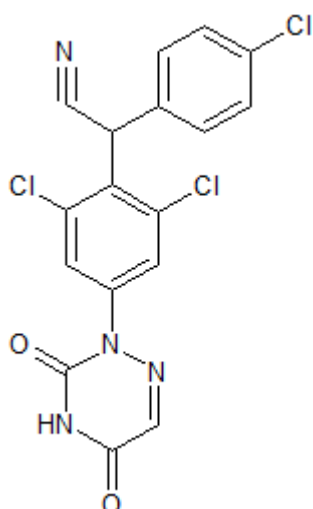
Flubendazol způsobuje inhibici energetického metabolismu parazitů. Narušuje metabolismus glukózy inhibicí syntézy tubulinu, čímž dochází k energetické vyčerpanosti a postupné destrukci parazitů [4].

Z hlediska bezpečnosti a toxicity je flubendazol považován za bezpečné anthelmintikum [11].

3.1.4. Diclazuril

Diclazuril, systematickým názvem 2-(4-chlorophenyl)-2-[2,6-dichloro-4-(3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)phenyl]acetonitril, označovaný také synonymem clinacox je syntetický triazinový derivát používaný k léčbě kokcidiózy jak u zvířat, zejména domácích králíků, tak i u člověka [2], [12].

3.1.4.1. Chemická struktura, vlastnosti látky



Obrázek č. 4 - strukturní vzorec diclazurilu

Diclazuril je bílý až světle žlutý prášek téměř nerozpustný ve vodě [13]. Je rozpustný v dimethylsulfoxidu a jeho teplota tání je udávána 290,5 °C [14].

3.1.4.2. *Mechanismus účinku a toxicita*

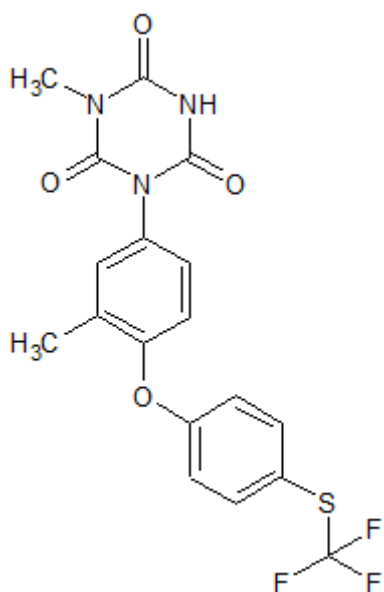
Mechanismus účinku není přesně znám, nicméně předpokládá se jeho účinek na pohlavní i nepohlavní stadia kokcií, kdy dochází k přerušení vylučování oocyst a tím k přerušení životního cyklu parazita [3].

Z hlediska toxicity je diclazuril považován za bezpečné léčivo, ale neměl by být podáván nosnicím, z důvodu možné kontaminace vajec určených ke konzumaci člověkem [2], [6].

3.1.5. Toltrazuril

Toltrazuril, systematickým názvem 1-methyl-3-[3-methyl-4-[4-(trifluoromethylsulfanyl)fenoxy]fenyl]-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion, označován také synonymy baycox, toltrazurilo nebo toltrazurilum, je triazinový derivát používaný k léčbě a prevenci kokcidióz způsobených prvky z rodů *Eimeria* a *Isospora* [2], [15].

3.1.5.1. Chemická struktura, vlastnosti látky



Obrázek č. 5 - strukturní vzorec toltrazurilu

Toltrazuril je bílá práškovitá látka dobře rozpustná ve vodě i dimethylsulfoxidu. Jeho teplota tání leží při 194 °C [16].

3.1.5.2. Mechanismus účinku a toxicita

Toltrazuril je aktivní proti všem vývojovým intracelulárním stádiím kokcií – schizontům, mikro i makro gamontům. Jeho vlivem dochází k inhibici nukleárního dělení těchto parazitů [2], [17], [18].

Toltrazuril by neměl být podáván zvířatům, jejichž vejce jsou určena ke konzumaci lidmi [19].

3.2. Metody hodnocení získané rešerší

Byly vyhledány články týkající se stanovení jednotlivých analytů za pomoci metody HPLC. Z těchto článků a znalostí katedry analytické chemie bylo vycházeno ve vývoji metody popsané v experimentální části.

3.2.1. Metody hodnocení pro robenidin

Kolona	Zorbax Sil (5 μ m, 250 x 4,6 mm), (Agilent, USA); předkolona Brownlee (7 μ m, 150 x 3,2 mm), (PerkinElmer) USA)
Mobilní fáze	Chloroform – hexan – tetrahydrofuran – methanol (50:50:2:1, v/v)
Nástřik	20 μ l
Průtok	2 ml/min
Detekce	Fluorescenční detektor (λ_{ex} - 320 nm, λ_{em} - 485 nm)
Teplota	80 °C
Režim	Izokratický
Článek	[20]

Kolona	Novapak C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm), (Waters, USA); předkolona Hypersil C18 Securigard (3,0 x 2,0 mm), (Thermoscientific, USA)
Mobilní fáze	ACN - fosforečnan amonný 0,05 M, pH 6,8 (65:35, v/v)
Nástřik	100 μ l
Průtok	1,5 ml/min
Detekce	UV 317 nm
Teplota	40 °C
Režim	Izokratický
Článek	[21]

Kolona	XTerra RP18 (4 μ m, 150 x 3,0 mm), (Waters, USA)
Mobilní fáze	Methanol 660 ml, voda 334 ml, kyselina fosforečná 4 ml, triethylamin 2 ml, natrium-hexan-1-sulfonát 1,8822 g. pH 3,5
Nástřik	10 μ l
Průtok	1 ml/min
Detekce	314 nm
Teplota	35 °C
Režim	Izokratický
Článek	[22]

Kolona	Purospher C18 (3 μ m, 125 x 3,0 mm), (Merck, Polsko)
Mobilní fáze	MeOH – H ₂ O – TFAA (70:30:0,1 v/v)
Nástřik	20 μ l
Průtok	0,7 ml/min
Detekce	UV 317 nm
Teplota	10 °C
Režim	Izokratický
Článek	[23]

3.2.2. Metody hodnocení pro lasalocid A

Kolona	C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm), (Kromasil, Švédsko)
Mobilní fáze	MeOH – H ₂ O – TFA 0,45% (90:10:3, v/v)
Nástřik	100 μ l
Průtok	1,2 ml/min
Detekce	UV 315 nm
Teplota	25 °C
Režim	Izokratický
Článek	[24]

3.2.3. Metody hodnocení pro flubendazol

Kolona	Supelcosil LC 18 DB (5 μ m, 150 x 4,6 mm), (Supelco, USA) Ochranná kolona Supelguard Lc 18 DB (5 μ m, 20 x 4,6 mm,)
Mobilní fáze	ACN- fosfátový pufr 0,017M, pH 3 (30:70, v/v)
Nástřik	10 μ l
Průtok	1 ml/min
Detekce	UV 300 nm
Teplota	Pokojová
Režim	Gradientový
Článek	[25]

3.2.4. Metody hodnocení pro diclazuril

Kolona	Symmetry C18 (5 µm, 150 x 2,1 mm), (Waters, USA) předkolona Alltima C18 (5 µm, 75 x 2,1 mm), (Alltech, USA)
Mobilní fáze	H ₂ O – ACN, okyseleno 0,1% FA (100:0, v/v)
Nástřik	10 µl
Průtok	0,25 ml/min
Detekce	MS
Teplota	35 °C
Režim	Gradientový
Článek	[26]

3.2.5. Metody hodnocení pro toltrazuril

Kolona	ACQUITY UPLC CORTECS C18+ (1,6 µm, 100 x 2,1 mm), (Waters, USA)
Mobilní fáze	H ₂ O – ACN (48:52, v/v)
Nástřik	10 µl
Průtok	0,2 ml/min
Detekce	UV 243 nm
Teplota	30 °C
Režim	Gradientový
Článek	[27]

3.3. QuEChERS

QuEChERS je zkratka anglických slov, které tuto metodu dokonale vystihují, a to

- Quick
- Easy
- Cheap
- Effective
- Rugged
- Safe

neboli rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní a bezpečná analytická metoda. Tato metoda byla vyvinuta v letech 2001 – 2002 německo-kyperským chemikem Michelangelem Anastassiadem a americkým vědcem Stevenem J. Lehotayem [28].

Metoda byla původně vyvinuta pro analýzu veterinárních drog, především anthelmintik a tyreostatik ve zvířecích tkáních. Avšak největší uplatnění nalézá především v analýze pesticidů v rostlinných tkáních [28].

QuEChERS metoda byla vyvinuta tak, aby eliminovala zbytečně komplikované a časově náročné analytické kroky. Umožňuje rychlou analýzu většího množství vzorků za použití minimálního množství rozpouštědla, především acetonitrilu [29].

Příprava vzorku metodou QuEChERS obsahuje následující kroky [30]:

- Extrakce ze vzorku rozpouštědlem – jako rozpouštědlo bývá nejčastěji používán acetonitril, dále ethyl acetát nebo aceton.
- Rozdělení fází přidavkem síranu hořečnatého či síranu hořečnatého v kombinaci s jinými solemi, například s chloridem sodným či octanem sodným. Bezvodý síran hořečnatý je výborným sušidlem a při jeho hydrataci dochází k exotermní reakci, což má za následek zvýšení účinnosti extrakce. Teplota vzorku se může zvýšit až na 40 °C [31].
- Třepání a centrifugace
- Přečištění pomocí disperzní SPE (například vsypání PSA), centrifugace
- Následně může být vzorek analyzován za pomoci plynové nebo kapalinové chromatografie.

Tato metoda může být modifikována v závislosti na analyzovaných vzorcích. Měněny mohou být následující parametry [30]:

- typ vzorku, rozpouštědla a přidaných solí
- množství přidávaných solí a obsah vody
- pH, technika třepání či míchání a také doba extrakce

Námi vyzkoušené modifikace metody QuEChERS jsou popsány v experimentální části v kapitole 5.3. – Optimalizace přípravy vzorku.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Přístrojové vybavení použité k experimentu

Kapalinový chromatograf LC 2010 C, Shimadzu, Japonsko

Chromatografický software Class VP 6.13, Shimadzu, Japonsko

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Filtrační zařízení pro přípravu ultračisté vody Milli-Q RG, Millipore, USA

Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze Millipore, USA

Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Badelin, Německo

Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo

pH metr, Hanna instruments, Německo

UV/VIS Spektrometr Hewlett-Packard 8453A, Agilent, USA

IKA Vortex Genius 3, IKA, Německo

ETA sekáček potravin, typ 20789050, ETA, Česká republika

4.2. Použité kolony

Discovery HS C18 (4,6 x 100 mm, 5 μ m), Sigma-Aldrich®, Česká republika

XTerra MS C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m), Waters, USA

Discovery RP Amide C 16 (3,0 x 250 mm, 5 μ m), Sigma-Aldrich®, Česká republika

Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m), Sigma-Aldrich®, Česká republika

Ascentis Express F5 (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m), Sigma-Aldrich®, Česká republika

4.3. Chemikálie, sorbenty pro QuEChERS a standardy, biologický materiál, použité mobilní fáze

4.3.1. Chemikálie

Methanol Chromasolv, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: STBF6927V

Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: STBC0366V

Kyselina octová, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: SZBF0150V

Acetonitril Chromasolv, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: STBF7526V

Hydrogenfosforečnan amonný, Lach-Ner, Česká republika, šarže: neuvedena

Triethylamin, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: STBD1993V

Kyselina fosforečná, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: BCBJ4494V

Kyselina mravenčí, Penta, Česká republika, šarže: 1511181110

Octan amonný, Sigma Life Science, Česká republika, šarže: SLBM7929V

Síran hořečnatý bezvodý, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: MKB0817V

Chlorid sodný, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: SZBB3550V

Octan sodný bezvodý, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: 020M0213V

Síran sodný bezvodý, Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: SLBK5317V

Amoniak, Penta, Česká republika, šarže: 1612011211

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Sigma-Aldrich®, Česká republika, šarže: S28424-275

4.3.2. Sorbenty pro QuEChERS

Supel QuE Z-Sep C18, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika

PSA, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika

4.3.3. Standardy

Diclazuril VETRANAL™, Fluka® Analytical, Česká republika, šarže: SZBD161XV

Toltrazuril VETRANAL™, Fluka® Analytical, Česká republika, šarže: SZBD233XV

Flubendazol VETRANAL™, Fluka® Analytical, Česká republika, šarže:SZBB157XV

Robenidine hydrochloride VETRANAL™, Fluka® Analytical, Česká republika, šarže: SZBS099XV

Lasalocid A sodium salt solution 100ng/μl in acetonitrile VETRANAL™, Fluka® Analytical, Česká republika, šarže: SZBD071XV

4.3.4. Biologický materiál

kuřecí prsa

4.3.5. Použité mobilní fáze

0,1% kyselina octová s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

50mM fosforečnanový pufr o pH 6,8 (pH bylo upraveno triethylaminem) s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

0,1% kyselina mravenčí o pH 4 (pH bylo upraveno triethylaminem) s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

0,1%kyselina mravenčí o pH 5 (pH bylo upraveno triethylaminem) s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

0,1% kyselina octová o pH 9 (pH bylo upraveno triethylaminem) s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

0,1% trifluoroctová kyselina o pH 2 s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

20 mM TRIS pufr o pH 9 s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

20mM octan amonný o pH 6,8 s acetonitrilem v poměru 50:50 (v/v)

4.4. Výsledné podmínky analýzy, příprava zásobních roztoků standardu, standardu a vzorku pro výslednou analýzu

4.4.1. Výsledné podmínky analýzy

Analytická kolona

Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 µm)

Mobilní fáze

0,1% kyselina mravenčí o pH 4 (pH upraveno triethylaminem) s ACN v poměru 50:50 (v/v)

Průtok

0,8 ml/min

Doba analýzy

15 min

Detekce

UV při 245 nm, UV při 310 nm

Nástřik

20 µl

Teplota

30 °C

Režim

Izokratický

4.4.2. Příprava zásobních roztoků standardu, standardu a vzorku pro výslednou analýzu

4.4.2.1. Zásobní roztoky standardů pro další ředění

Toltrazuril

Vzhledem k jeho dobré rozpustnosti v methanolu, byl připraven zásobní roztok o koncentraci 5 mg/ml, a to rozpuštěním 5 mg standardu v 1000 µl methanolu.

Robenidin

U robenidinu nebylo dosaženo tak vysoké koncentrace zásobního roztoku, z důvodu nedostatečné rozpustnosti v methanolu, a to ani při rozpouštění v ultrazvukové lázni. Proto byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml, a to rozpuštěním 1 mg standardu v 1000 µl methanolu.

Diclazuril

Diclazuril se poměrně dobře rozpouštěl ve směsi DMSO s MeOH v poměru 1:1. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 5 mg/ml, a to smísením 5 mg standardu s 500 µl methanolu a 500 µl DMSO.

Flubendazol

Zásobní roztok flubendazolu byl připraven obdobně jako roztok diclazurilu s tím rozdílem, že výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Tato koncentrace byla dosažena smísením 1 mg standardu s 500 µl methanolu a 500 µl DMSO.

Lasalocid A

Byl použit roztok standardu o koncentraci 100 ng/µl.

4.4.2.2. Příprava standardního roztoku pro HPLC analýzu

Směs pro přípravu standardu

Ze zásobních roztoků byla připravena zásobní směs analytů. Z každého ze zásobních roztoků toltrazurilu a diclazurilu o koncentraci 5mg/ml bylo odebráno 50 µl, ze zásobních roztoků robenidinu a flubendazolu o koncentraci 1 mg/ml bylo odebráno 200 µl. Takto vzniklá zásobní směs analytů byla 4x naředěna ACN, tímto vznikla směs pro přípravu standardu.

Standardní roztok pro HPLC analýzu

Ze směsi pro přípravu standardu bylo odebráno 50 µl, bylo přidáno 200 µl lasalocidu A a doplněno směsí ACN:DMSO (8:2, v/v) do 10 ml. Tímto vznikl standardní roztok pro HPLC analýzu.

4.4.2.3. Příprava vzorku

Do centrifugační zkumavky bylo naváženo 5 g rozmixovaných kuřecích prsou. Směs pro přípravu standardu byla 10x naředěna ACN. 50 µl takto naředěné směsi a 20 µl standardního roztoku lasalocidu A o koncentraci 100 ng/µl bylo přidáno do centrifugační zkumavky s naváženými kuřecími prsy. Po 10 minutách bylo přidáno 5 ml vody, 10 ml ACN a směs byla 30 s třepána za použití Vortexu. Poté byla přidána směs 4 g Na₂SO₄ a 1 g NaCl. Tato směs byla 1 min třepána v ruce a 2 min na Vortexu. Centrifugační zkumavka byla vložena do centrifugy a centrifugována při 4020 rpm po dobu 5 min. Z této zkumavky bylo odebráno 5 ml supernatantu a zakoncentrováno odpařením dusíkem. Odparek byl rozpuštěn v 500 µl směsi ACN:DMSO (8:2, v/v) a tato směs byla zfiltrována přes 0,22 µl PTFE filtr do vialky. Takto připravený roztok byl použit k analýze.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

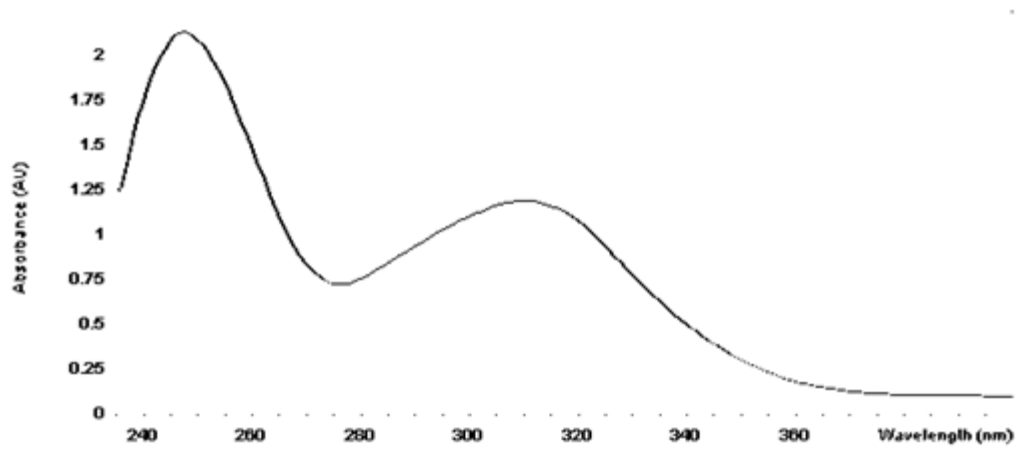
5.1. Zjištění výchozích podmínek a optimalizace parametrů

5.1.1. Výběr vhodných vlnových délek

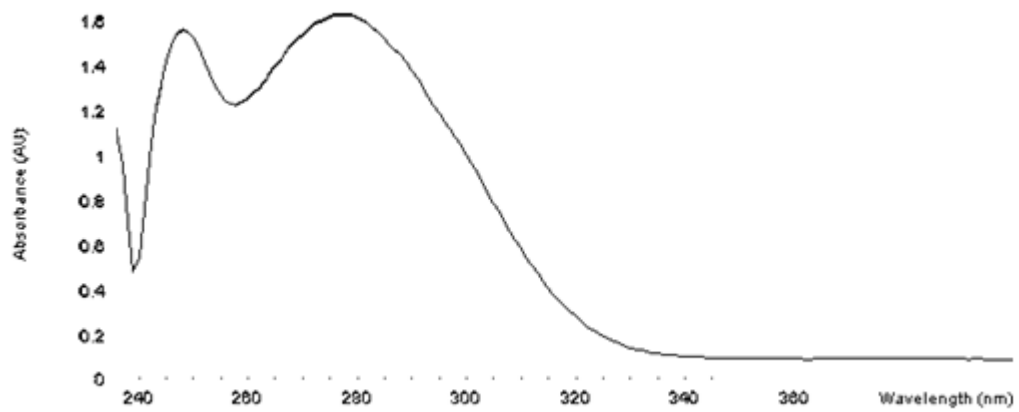
Roztoky pro měření UV spekter

- Flubendazol a diclazuril
2 mg standardu rozpuštěno v 1 ml DMSO
- Toltrazuril a robenidin
2 mg standardu rozpuštěno v 1 ml MeOH
- Lasalocid A
100 µl doplněno do 1 ml MeOH

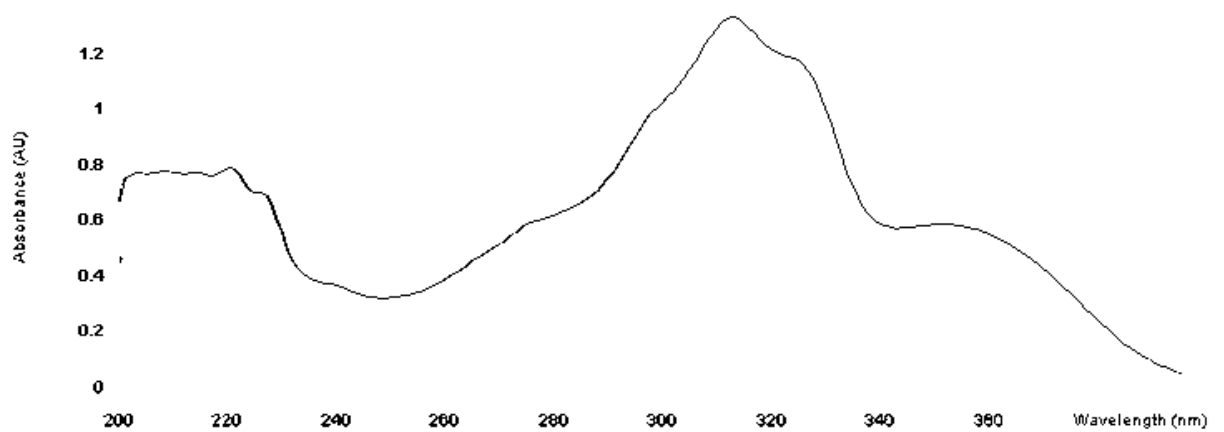
Pomocí takto připravených roztoků byla proměřena UV spektra každé jednotlivé látky a vybrány vhodné hodnoty vlnových délek, které byly následně použity k detekci. Flubendazol vykazoval dvě absorpční maxima při 245 nm a 310 nm (viz Obrázek č. 6). Diclazuril vykazoval dvě maxima při 245 nm a 275 nm (viz Obrázek č. 7). Robenidin vykazoval výrazné absorpční maximum při 310 nm (viz Obrázek č. 8). Toltrazuril vykazoval absorpční maxima při 205 nm a 245 nm (viz Obrázek č. 9). Lasalocid A vykazoval výrazné maximum při 210 nm a druhé malé při 310 nm (viz Obrázek č. 10).



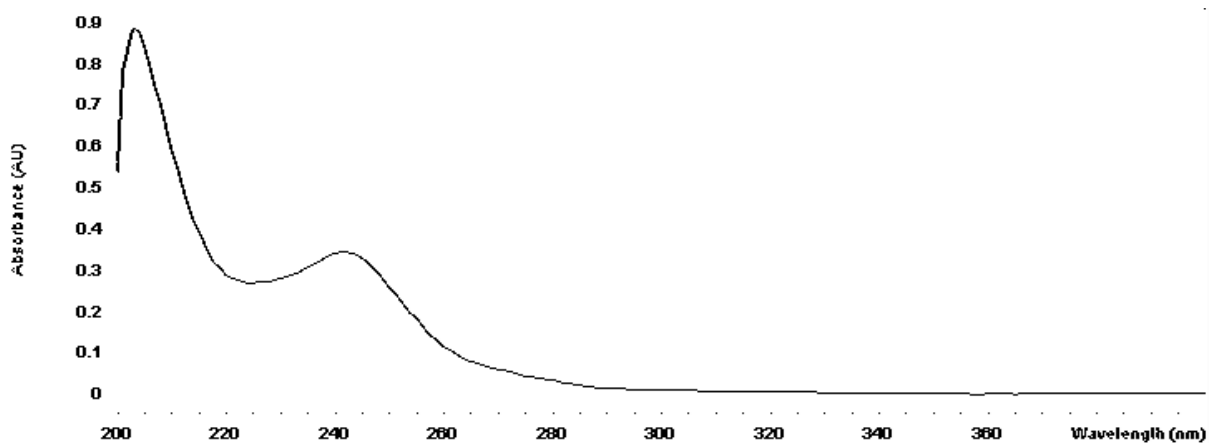
Obrázek č. 6 - absorpční UV spektrum flubendazolu



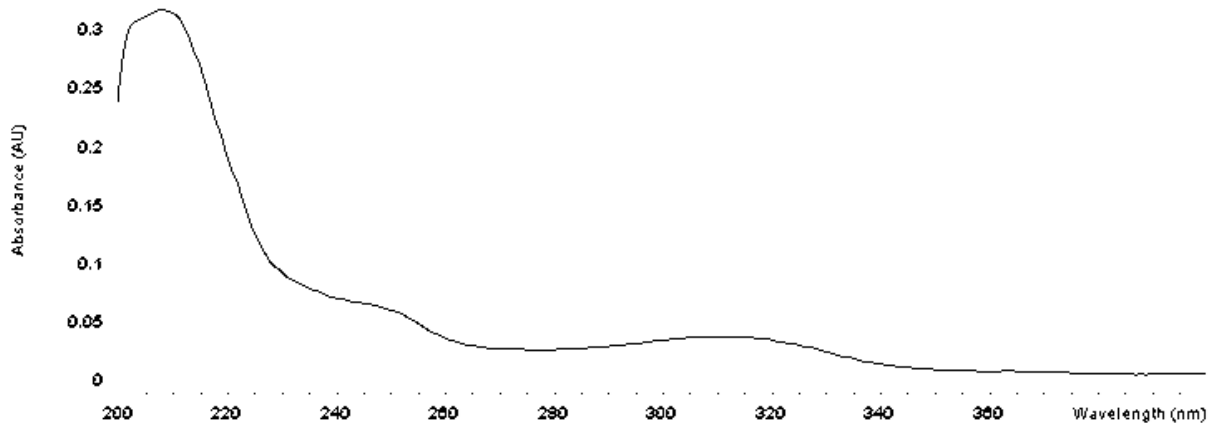
Obrázek č. 7 - absorpční UV spektrum diclazurilu



Obrázek č. 8 - absorpční UV spektrum robenidinu



Obrázek č. 9 - absorpční UV spektrum toltrazurilu

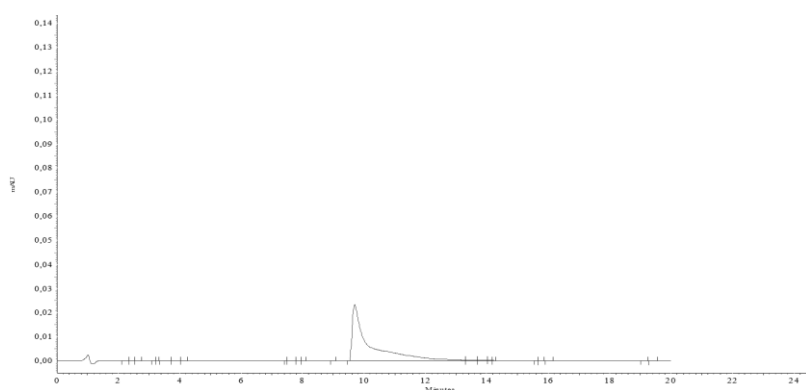


Obrázek č. 10 - absorpční UV spektrum lasalocidu

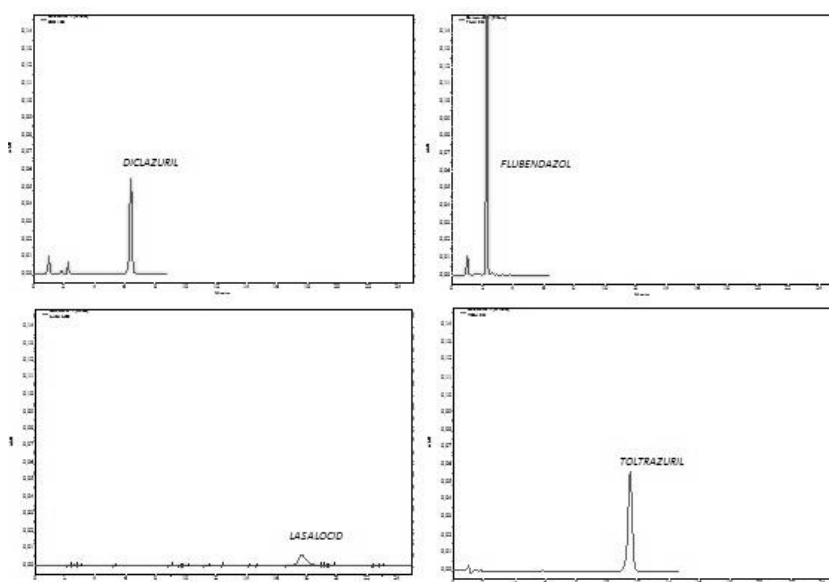
Pro detekci byly vybrány dvě vlnové délky. Pro flubendazol, diclazuril, toltrazuril a lasalocid A byla vybrána vlnová délka 245 nm, pro robenidin pak vlnová délka 310 nm.

5.2. Výběr vhodné mobilní fáze a kolony

Všechny níže uvedené chromatogramy u jednotlivých experimentů byly měřeny při vlnové délce 245 nm. Vzhledem k vlastnostem analyzovaných látek a zkušenostem katedry analytické chemie, byla nejprve vyzkoušena kolona Discovery HS C18 (4,6 x 100 mm, 5 μ m), jako mobilní fáze zde byla vybrána 0,1% AA pH 5 (pH bylo upraveno triethylaminem) – ACN v poměru 50:50 (v/v). Za těchto podmínek pík robenidinu nebyl dostatečně kvalitní a symetrický (viz Obrázek č. 11), proto bylo přistoupeno ke změnám mobilní fáze. Píky ostatních analytů vykazovaly dostatečnou symetričnost (viz Obrázek č. 12).

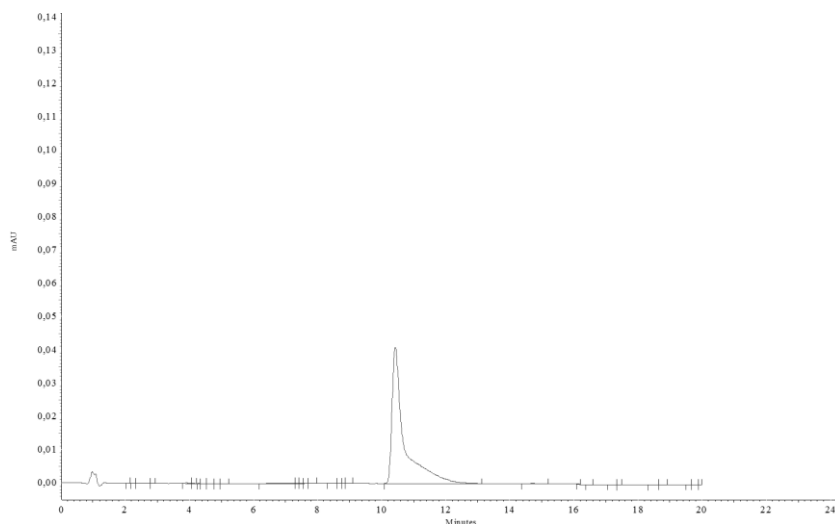


Obrázek č. 11 - robenidin



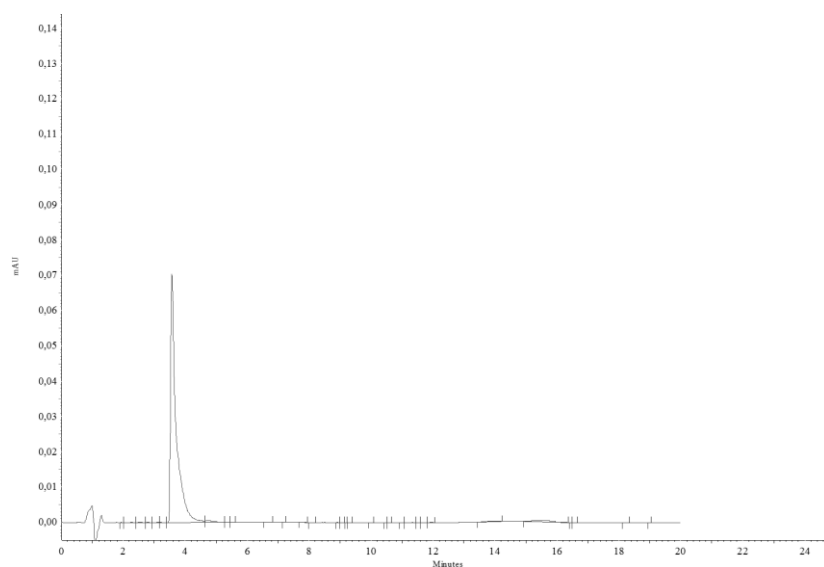
Obrázek č. 12 - píky jednotlivých analytů

Již po prvních experimentech bylo jasné, že robenidin v souvislosti s jeho strukturou vykazuje odlišné chromatografické chování proti ostatním testovaným analytům, proto byla optimalizace chromatografických podmínek zaměřena především na tento analyt. Jako další mobilní fáze byl vyzkoušen 50mM hydrogenfosforečnan amonný o pH 7 (pH upraveno pomocí kyseliny fosforečné a triethylaminu) – ACN (50:50, v/v). Výrazného zlepšení nebylo dosaženo (viz Obrázek č. 13).



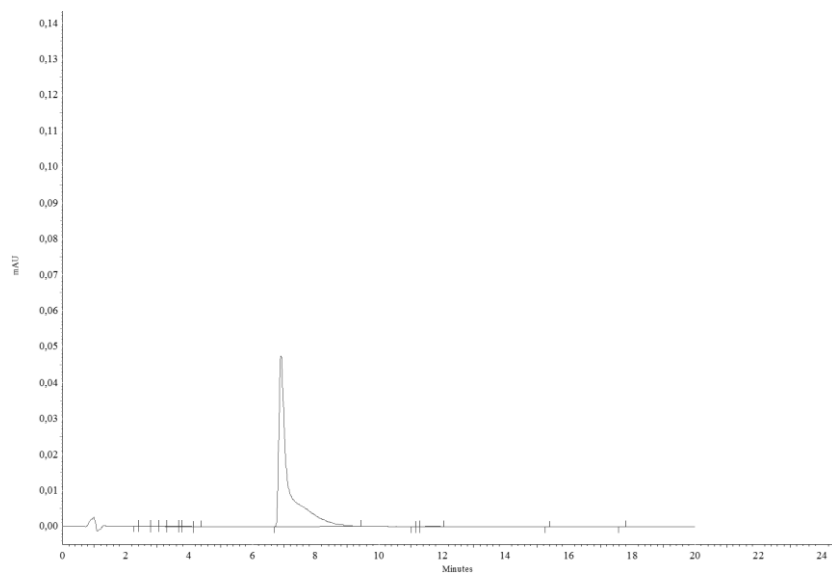
Obrázek č. 13 - robenidin

Jako další mobilní fáze byla zvolena 0,1% FA pH 4 - ACN (50:50, v/v). pH bylo upraveno pomocí triethylaminu. Pík byl symetričtější (viz Obrázek č. 14).



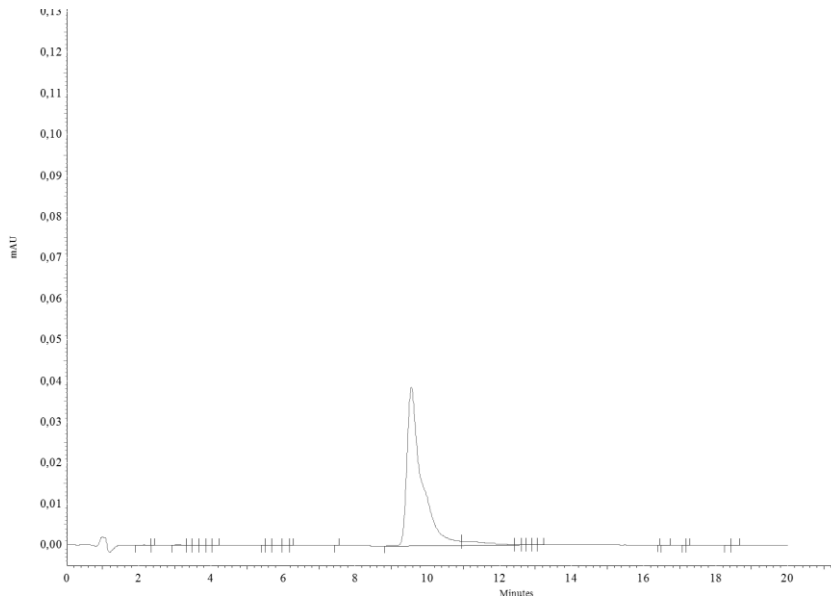
Obrázek č. 14 - robenidin

Další snahou o optimalizaci podmínek bylo zvýšení pH, proto byla použita 0,1% FA o pH 5 namísto původního pH 4. pH bylo opět upraveno za pomoci triethylaminu. Tato změna mobilní fáze se ovšem neosvědčila (viz Obrázek č. 15).



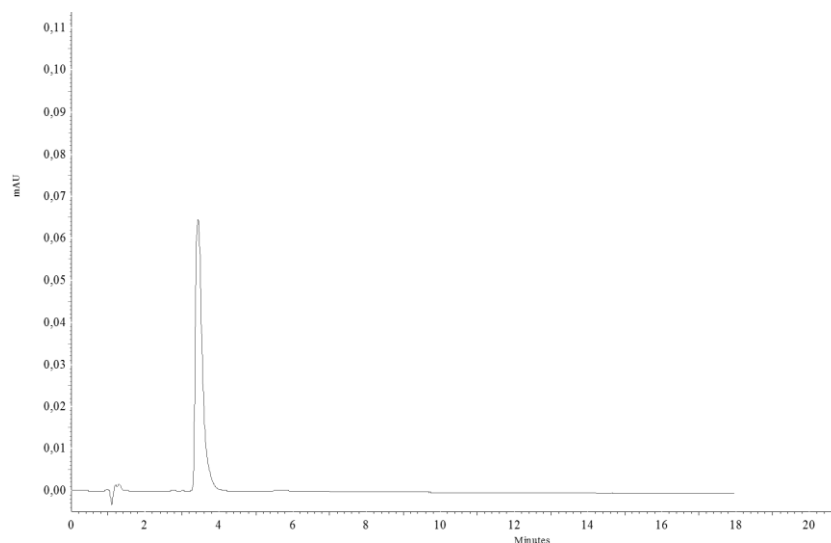
Obrázek č. 15 – robenidin

Snaha o zkvalitnění píku robenidinu pokračovala změnou stacionární fáze, a to záměnou za kolonu XTerra MS C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m). Jako mobilní fáze byla použita 0,1% AA pH 9,1 – ACN (50:50, v/v). Pík robenidinu stále neodpovídal představám (viz Obrázek č. 16).



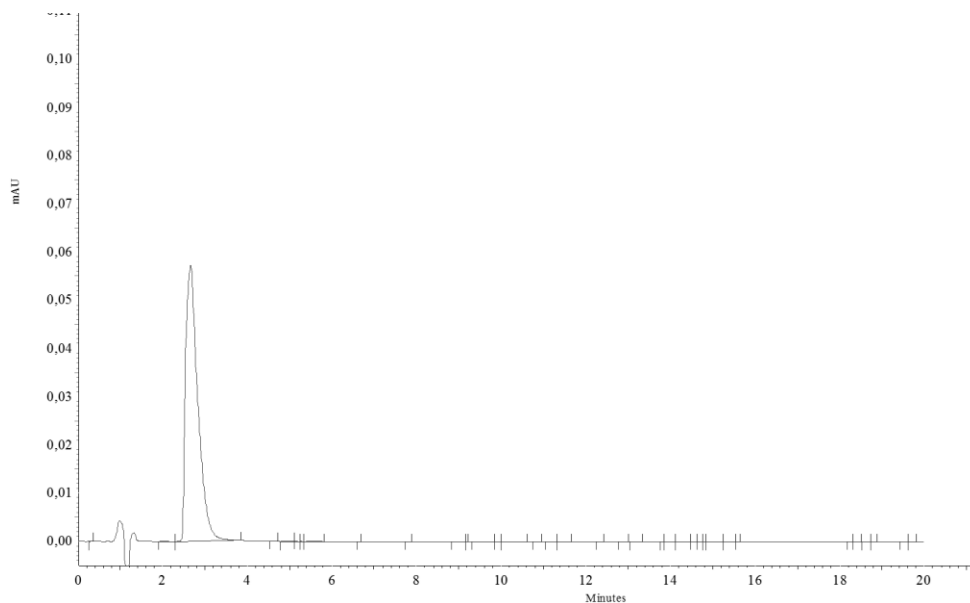
Obrázek č. 16 – robenidin

Druhou mobilní fází pro kolonu XTerra MS C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m) byla 0,1% TFAA pH 2 – ACN (50:50, v/v). Pík robenidinu se jevil poměrně symetricky (viz Obrázek č. 17).

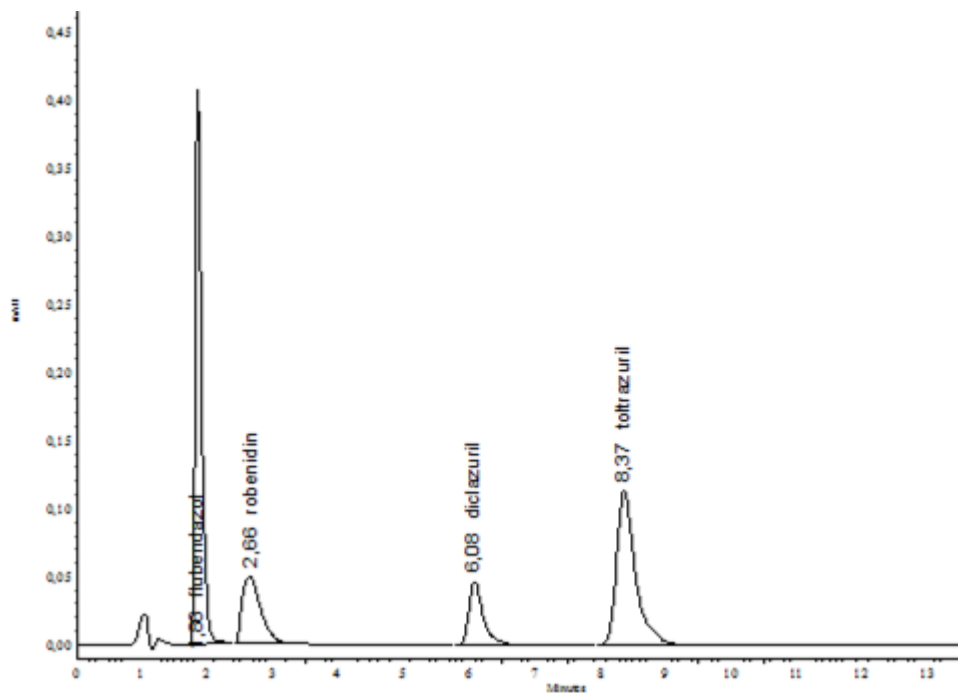


Obrázek č. 17 – robenidin

Třetí mobilní fází pro tuto kolonu byla 0,1% FA – ACN (50:50, v/v). Pík robenidinu se zdál být dostatečně symetrický (viz Obrázek č. 18), a proto byla proměřena i směs všech 5 analytů (100 μ l každého ze zásobních roztoků o $c = 1$ mg/ml, 100 μ l standardního roztoku lasalocidu a 500 μ l MeOH). Bohužel za těchto podmínek nebyl eluován lasalocid A (viz Obrázek č. 19), proto byla tato fáze vyzkoušena za podmínek gradientové eluce. Tato metoda se také neshvědčila.



Obrázek č. 18 – robenidin

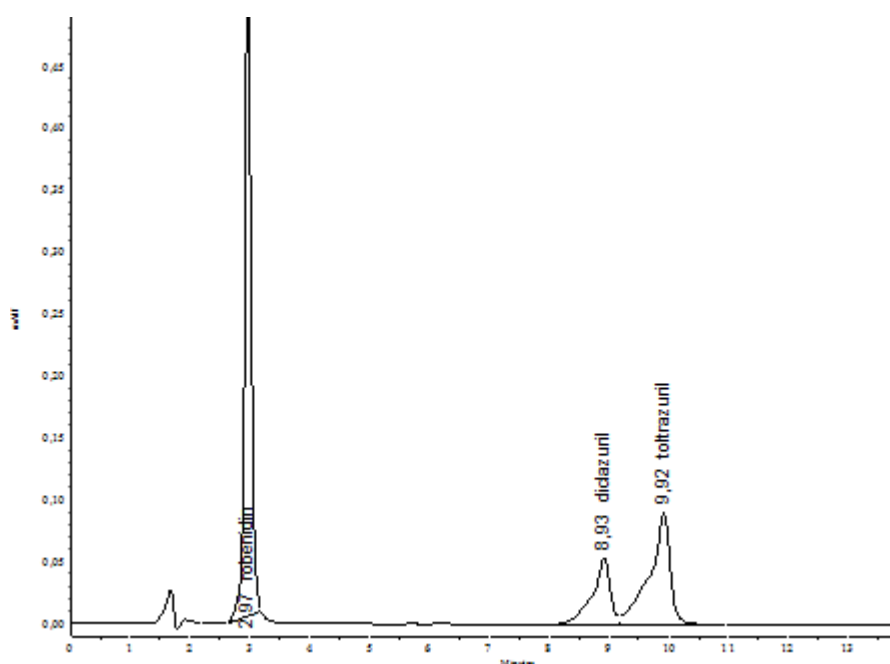


Obrázek č. 19 - směs analytů

Jako poslední mobilní fáze pro kolonu XTerra MS C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm) byl vyzkoušen 20 mM TRIS pufr o pH 9. Nicméně ani tyto podmínky se neosvědčily, neboť jednotlivé píky analytů nebyly dostatečně rozlišené.

Ve snaze optimalizovat podmínky analýzy byly navrženy a prozkoumány další tři stacionární fáze, a to sice Discovery RP Amide C16, Ascentis Express Phenyl Hexyl a Ascentis Express F5. U každé z kolon, byly vyzkoušeny tři mobilní fáze: 0,1% FA – ACN (50:50, v/v), 0,1 % FA pH 4 (upraveno triethylaminem) – ACN (50:50, v/v), 20 mM octan amonný pH 6,8 – ACN (50:50, v/v).

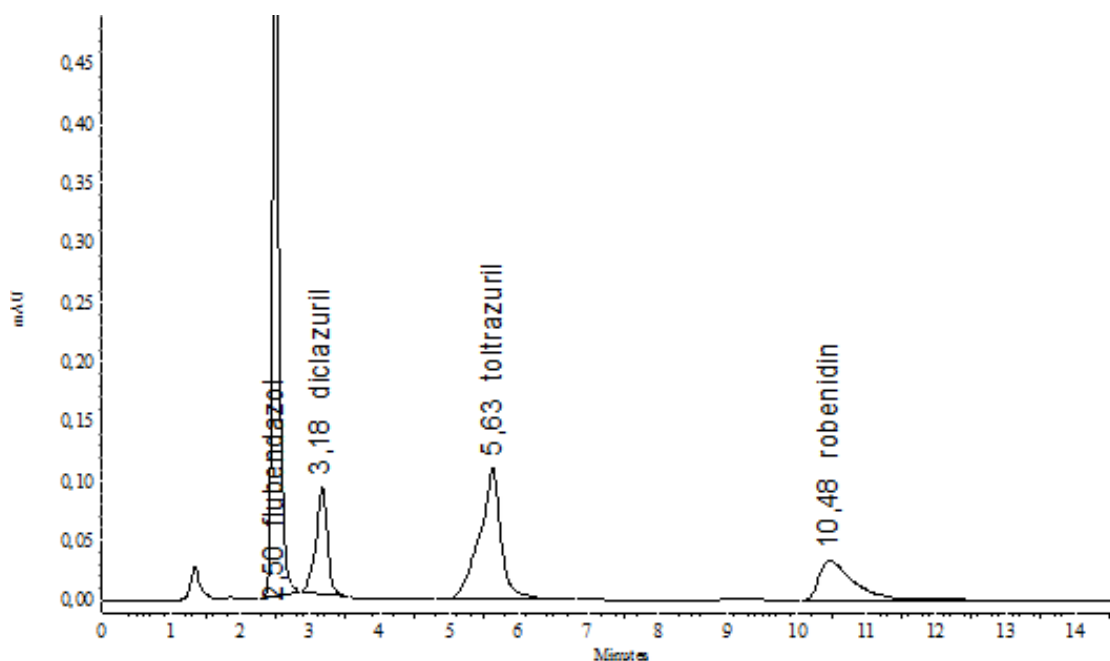
Jako první byla testována kolona Discovery RP Amide C16 (3,0 x 250 mm, 5 µm), na které byly vyzkoušeny všechny tři mobilní fáze. První mobilní fáze: 0,1% FA – ACN (50:50, v/v) nevyhovovala, neboť nebyly eluovány všechny analyty (viz Obrázek č. 20), proto byla vyzkoušena i gradientová eluce, která však stále nebyla vyhovující.



Obrázek č. 20 - směs analytů

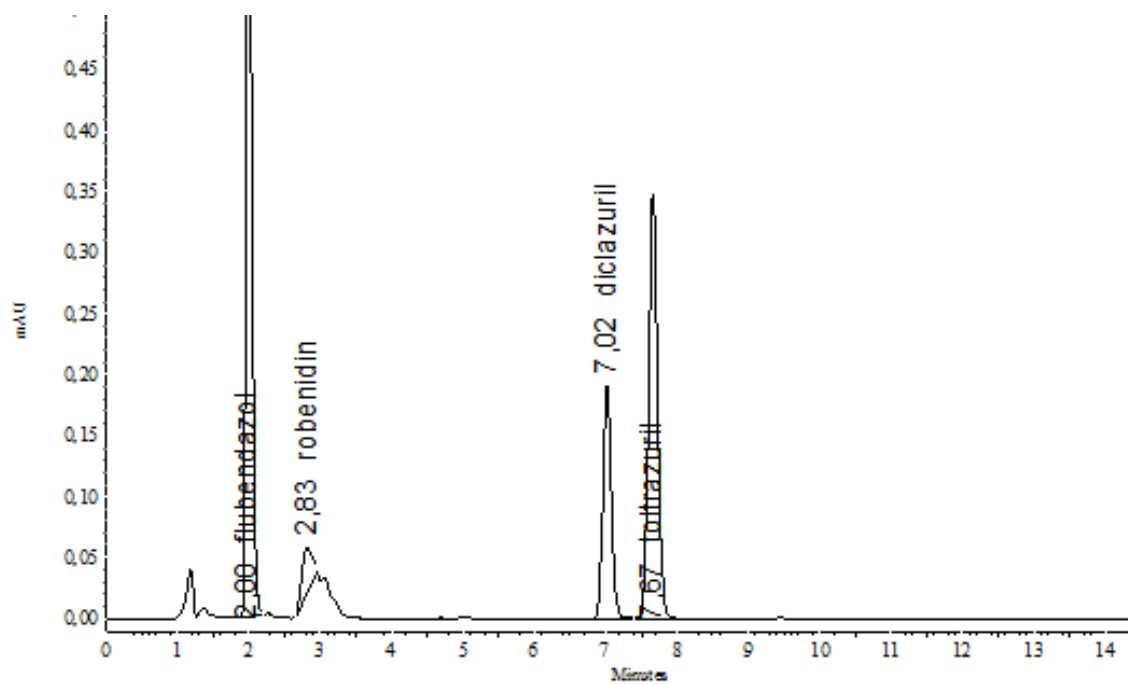
Druhá mobilní fáze pro tuto kolonu: 0,1% FA pH 4 (pH upraveno triethylaminem) – ACN (50:50, v/v), byla též vyhodnocena jako nevyhovující.

Jako poslední mobilní fáze byl vyzkoušen 20 mM octan amonný o pH 6,8 – ACN (50:50, v/v) (viz Obrázek č. 21).

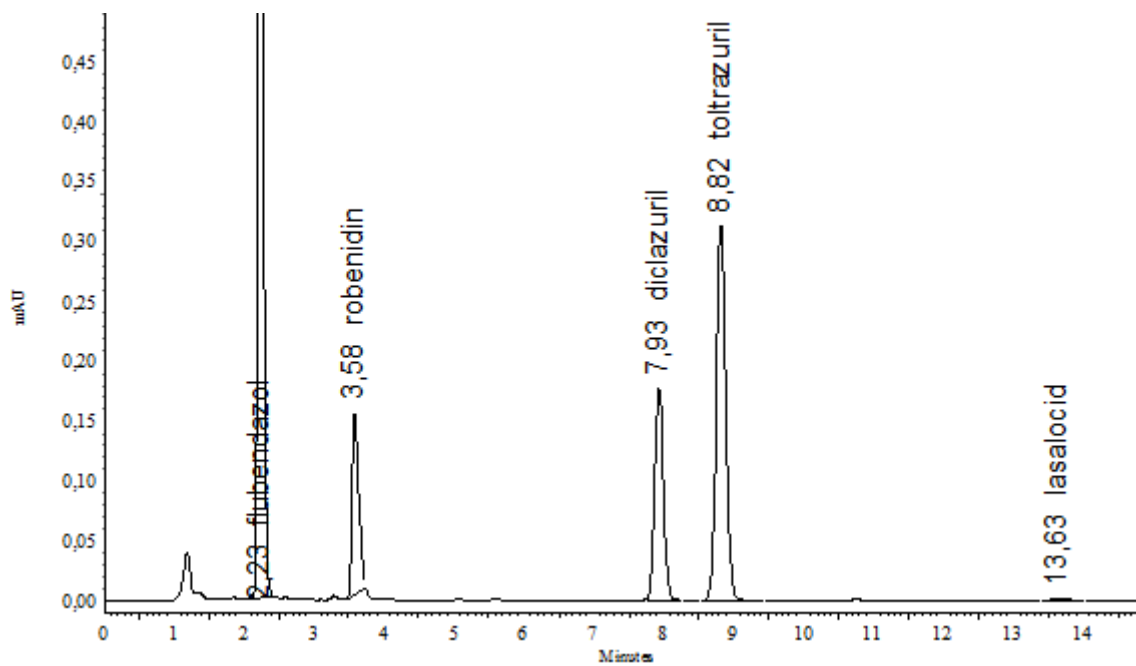


Obrázek č. 21 - směs analytů

Další stacionární fáze použitá v tomto experimentu byla kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m). Také u této kolony byly vyzkoušeny stejné tři mobilní fáze jako u předchozího experimentu. Jako první 0,1% FA – ACN (50:50, v/v) (viz Obrázek č. 22), jako druhá 0,1% FA pH 4 (pH upraveno triethylaminem) – (ACN 50:50, v/v) (viz Obrázek č. 23) a poslední 20 mM octan amonný pH 6,8 – ACN (50:50, v/v).

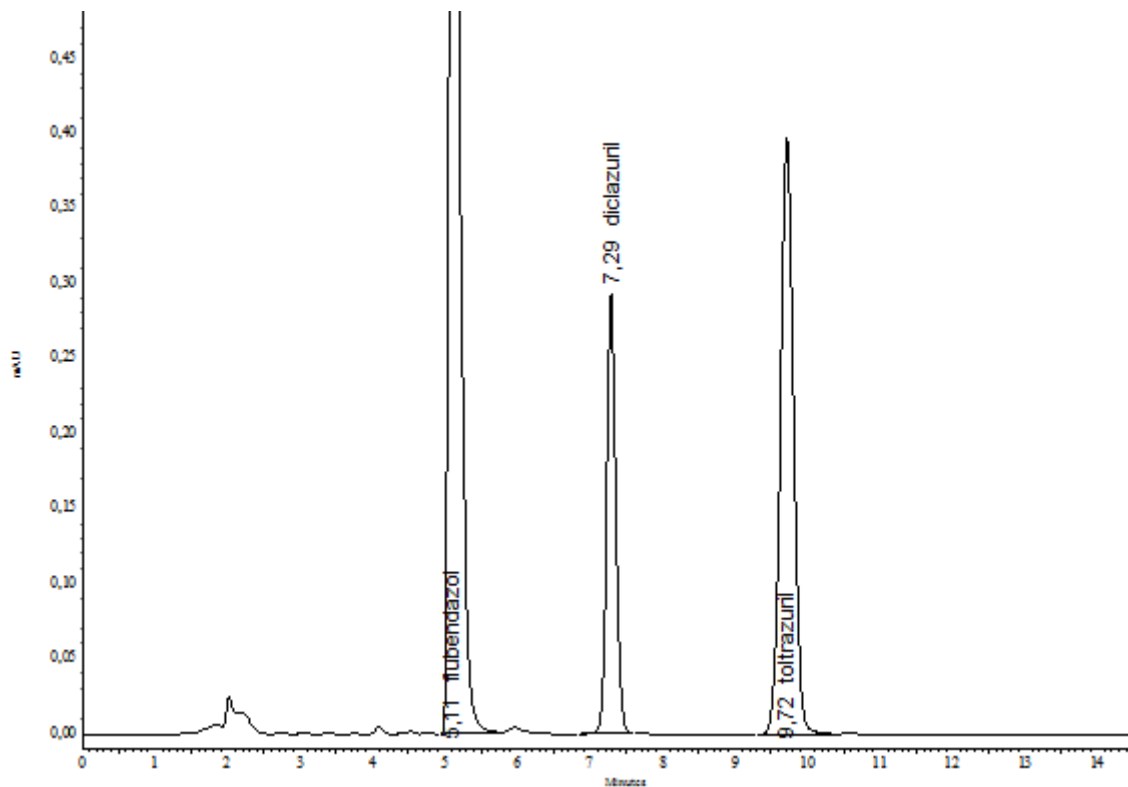


Obrázek č. 22 - směs analytů

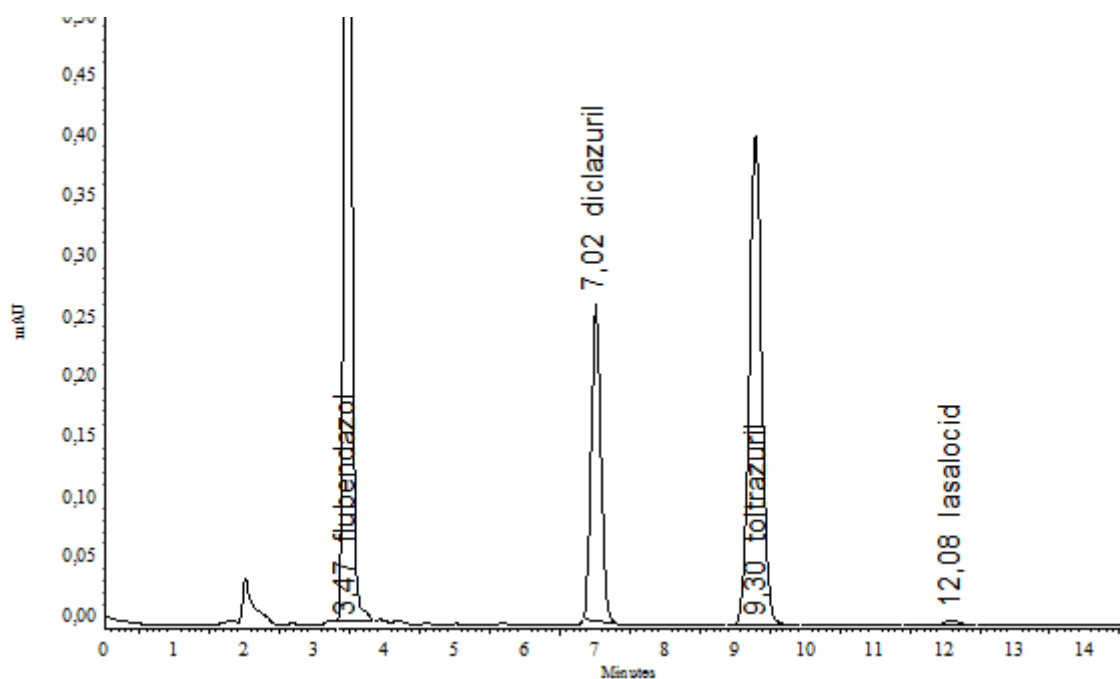


Obrázek č. 23 - směs analytů

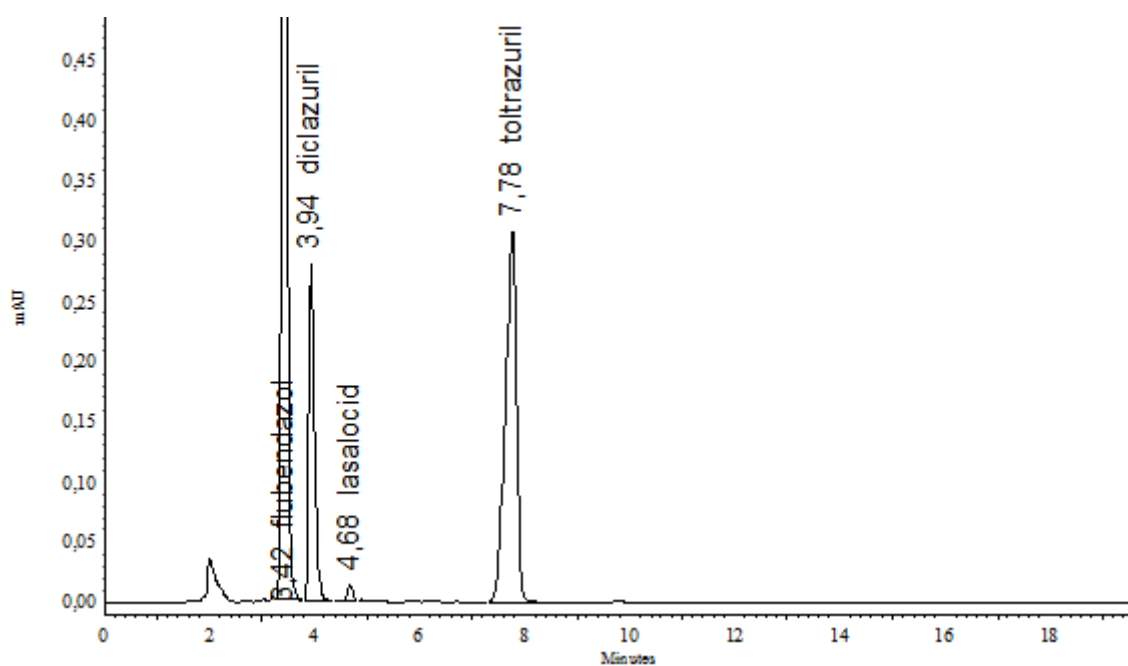
Stejný experiment byl proveden s třetí stacionární fází, kolonou Ascentis Express F5 (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m). První mobilní fáze: 0,1% FA – ACN (50:50, v/v). Za těchto podmínek nebyl eluován robenidin a lasalocid A (viz Obrázek č. 24), druhá mobilní fáze: 0,1% FA pH 4 (pH upraveno triethylaminem) – ACN (50:50, v/v). Zde nebyl eluován robenidin (viz Obrázek č. 25). Třetí mobilní fáze: 20 mM octan amonný pH 6,8 – ACN (50:50, v/v), opět nebyl eluován robenidin (viz Obrázek č. 26).



Obrázek č. 24- směs analytů



Obrázek č. 25 - směs analytů



Obrázek č. 26 - směs analytů

Jako nejvhodnější kombinace byla vybrána kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m) a mobilní fáze 0,1% FA o pH 4 (pH upraveno triethylaminem) s ACN v poměru 50:50 (v/v). Tyto podmínky byly použity pro následující experiment (viz Obrázek č. 23).

5.3. Optimalizace přípravy vzorku

Pro přípravu vzorku byla použita modifikovaná metoda QuEChERS. Byla hledána vhodná kombinace solí a organického rozpouštědla, čas třepání a vhodný sorbent na přečištění. Z důvodu malého množství standardního roztoku lasalocidu A, byl lasalocid A v počáteční části experimentu vyřazen a přidán k experimentu až později.

5.3.1. Výběr vhodné kombinace solí a organického rozpouštědla, vhodného sorbentu k přečištění

Jako první byly vyzkoušeny 4 kombinace solí a ACN, a to sice 4 g MgSO_4 + 1 g NaAc, 4 g Na_2SO_4 + 1 g NaAc, 4 g MgSO_4 + 1 g NaCl, 4 g Na_2SO_4 + 1 g NaCl. Postup přípravy vzorku byl následující: do každé ze 4 centrifugačních zkumavek bylo naváženo 5 g rozmixovaných kuřecích prsou. Následně bylo přidáno 50 μl zásobní směsi analytů (viz. kap. 4.4.2.2.). Po 10 minutách bylo přidáno 5 ml vody, 10 ml ACN a intenzivně třepáno po dobu 30 s. Poté byla do každé ze zkumavek vsypána jedna kombinace solí, 2 minuty třepána na Vortexu a následně centrifugována při 4020 rpm 5 minut. Supernatant byl přes 0,22 PTFE filtr zfiltrován a použit k HPLC analýze. Jako standardní roztok pro tuto analýzu byl použit roztok 50 μl zásobní směsi analytů (viz kap. 4.4.2.2.) v 10 ml ACN. Postup přípravy byl vyzkoušen pro každou kombinaci solí třikrát.

V dalším experimentu bylo žádoucí snížit koncentraci analyzovaných látek. Proto byla zásobní směs analytů 2x naředěna. Zároveň byly přidány další dvě kombinace solí, a to 5 g Na_2SO_4 + 1 g NaCl, a 5 g MgSO_4 + 1 g NaCl. Postup experimentu byl shodný s předcházejícím, avšak s tím rozdílem, že místo 10 ml ACN byla použita směs ACN-DMSO (8:2, v/v). Jako standardní roztok byl použit roztok 25 μl zásobní směsi analytů v 10 ml ACN-DMSO (8:2, v/v).

V dalším kroku byla směs analytů ještě 2x naředěna. V tomto kroku byly použity následující kombinace solí a organických rozpouštědel.

Kombinace solí, u kterých bylo jako rozpouštědlo použito 10 ml ACN

4 g MgSO₄ + 1 g NaCl

4 g Na₂SO₄ + 1 g NaCl

4 g MgSO₄ + 1 g NaAc

4 g Na₂SO₄ + 1 g NaAc

5 g MgSO₄

5 g Na₂SO₄

Kombinace solí, u kterých bylo použito jako rozpouštědlo 10 ml ACN-DMSO 8:2 (v/v)

4 g MgSO₄ + 1 g NaCl

4 g Na₂SO₄ + 1 g NaCl

4 g MgSO₄ + 1 g NaAc

4 g Na₂SO₄ + 1 g NaAc

5 g MgSO₄

5 g Na₂SO₄

Postup přípravy vzorku byl stejný jako u předchozího experimentu až do centrifugace vzorků.

Z důvodu velkého pozadí na chromatografickém záznamu byl přidán krok přečištění pomocí disperzní SPE. Pro vzorky obsahující DMSO byl vybrán jako sorbent pro přečištění PSA. 1,5 ml supernatantu bylo smíšeno se 150 mg sorbentu, na 3 min vloženo do ultrazvukové lázně, 5 minut centrifugováno při 4020 rpm, zfiltrováno přes 0,22µm PTFE filtr a podrobena HPLC analýze.

Pro vzorky obsahující jako organické rozpouštědlo pouze ACN byl jakožto sorbent vybrán Supel QuE Z-Sep C18. 5 ml supernatantu bylo smíšeno s 500 mg sorbentu a na 3 min vloženo do ultrazvukové lázně. Následně byl vzorek centrifugován při 4020 rpm po dobu 5 minut, zfiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr a podroben HPLC analýze.

Jako vhodné kombinace solí a organických rozpouštědel se jevíly kombinace:

4 g Na₂SO₄ + 1 g NaCl v 10 ml ACN

4 g MgSO₄ + 1 g NaAc v 10 ml ACN-DMSO (8:2, v/v)

Z důvodu optimalizace podmínek a výběru nejvhodnější kombinace solí a organického rozpouštědla, včetně vhodnosti použití sorbentu pro přečištění byl proveden další experiment.

Do každé ze 4 centrifugačních zkumavek bylo naváženo 5 g kuřecích prsou. K biologickému materiálu bylo přidáno 50 μ l směsi pro přípravu standardu (viz kapitola 4.4.2.2.) a 50 μ l standardního roztoku lasalocidu A. Po 10 minutách bylo ke 2 vzorkům přidáno 5 ml vody a 10 ml ACN. Ke zbývajícím 2 vzorkům bylo přidáno 5 ml vody a 10 ml směsi ACN-DMSO (8:2, v/v). Všechny vzorky byly 30 s třepány za použití Vortexu. Poté byla ke vzorkům obsahující DMSO přidána směs 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaAc a k zbylým 2 vzorkům 4 g Na_2SO_4 a 1 g NaCl. Tyto směsi byly 1 min třepány v ruce a 2 min na Vortexu. Centrifugační zkumavky byly vloženy do centrifugy a centrifugovány při 4020 rpm po dobu 5 min.

Vzorky obsahující 4 g Na_2SO_4 a 1 g NaCl a ACN jako rozpouštědlo

Z jednoho vzorku bylo odebráno asi 1 ml supernatantu, zfiltrováno přes 0,22 μ m PTFE filtr a podrobena analýze. 1,5 ml supernatantu bylo smíseno se 150 mg sorbentu PSA, na 3 min vloženo do ultrazvukové lázně, 5 minut centrifugováno při 4020 rpm, zfiltrováno přes 0,22 μ m PTFE filtr a podrobena HPLC analýze. 5 ml supernatantu bylo smíseno s 500 mg sorbentu Supel QuE Z-Sep C18 a na 3 min vloženo do ultrazvukové lázně. Následně byl vzorek centrifugován při 4020 rpm po dobu 5 minut, zfiltrován přes 0,22 μ m PTFE filtr a podroben HPLC analýze.

Ze vzorku druhého bylo opět odebráno asi 1 ml supernatantu, zfiltrováno přes 0,22 μ m PTFE filtr a podrobena HPLC analýze. 5 ml supernatantu bylo odpařeno pod dusíkem, odparek byl rozpuštěn v 500 μ l ACN-DMSO (8:2, v/v), zfiltrován přes 0,22 μ m PTFE filtr a podroben HPLC analýze.

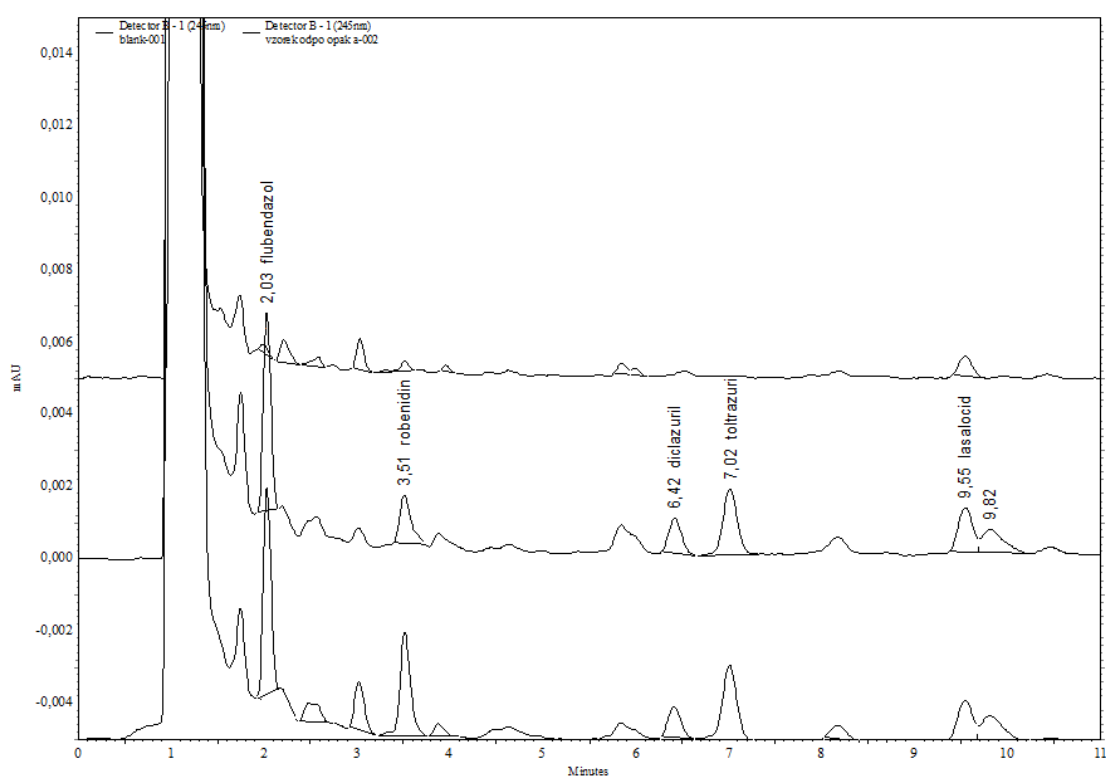
Vzorky obsahující 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaAc a ACN-DMSO (8:2, v/v)

Postup přípravy vzorků byl shodný se vzorky obsahující 4 g Na_2SO_4 a 1 g NaCl a ACN jako rozpouštědlo.

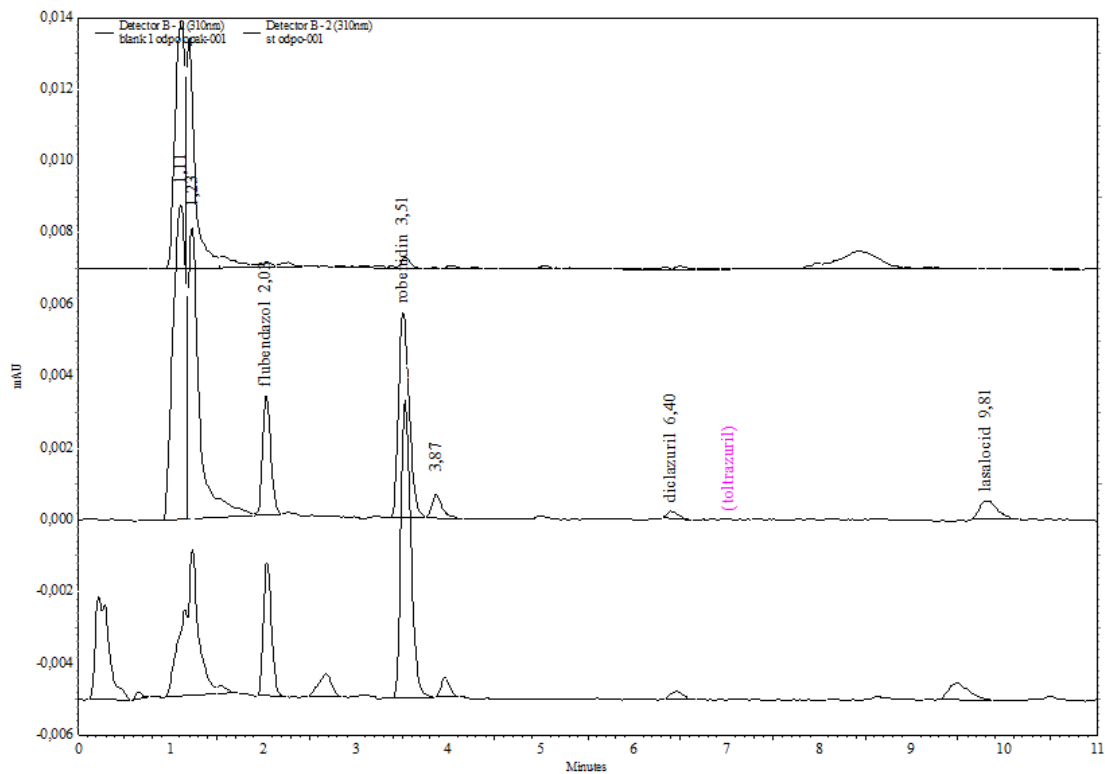
Použití sorbentů se neosvědčilo, neboť jejich použití výrazně snížilo výtěžnost reakce.

Jako nejvhodnější kombinace podmínek vzhledem k výtěžnosti a kvalitě jednotlivých píků byla vyhodnocena směs 4 g Na₂SO₄ a 1 g NaCl a ACN jako rozpouštědla bez použití sorbentů a za použití dusíku k zakoncentrování vzorku (viz Obrázek č. 27, Obrázek č. 28 a Tabulka č. 1). Nicméně bylo žádoucí ještě snížit koncentraci analyzovaných látek, proto byla směs pro přípravu standardu naředěna ještě 10x. 50 µl takto naředěné směsi bylo použito společně s 20 µl standardního roztoku lasalocidu A k finální HPLC analýze a validaci metody (viz kap. 4.4.2.3. – Příprava vzorku).

Na obrázku č. 27 a 28 je vidět porovnání dvou měření vzorku a blanku – vzorku kuřecího masa bez přídavku standardů zpracovaného stejným postupem.



Obrázek č. 27 - chromatogram směsi při 245 nm



Obrázek č. 28 - chromatogram směsi při 310 nm

Tabulka č. 1 – výtěžnost

Analyt	Plocha (A)	Výtěžnost
Flubendazol	52086	104,14%
Robenidin	107933	103,76%
Diclazuril	31639	113,99%
Toltrazuril	39762	111,77%
Lasalocid A	15960	121,99%

Výtěžnost analytů byla hodnocena proti standardu, který byl připraven dle kapitoly 4.4.2.2. a hodnocen při 245 nm s výjimkou robenidinu a lasalocidu A, které byly hodnoceny při 310 nm. Lasalocid A byl nakonec hodnocen při 310 nm vzhledem k píku ve vzorku blanku se stejným retenčním časem při 245 nm.

5.4. Částečná validace metody

5.4.1. Test vhodnosti chromatografického systému – SST

5.4.1.1. Opakovatelnost analýzy

Byl opakovaně dávkován roztok analytů v ACN-DMSO (8:2, v/v) o koncentraci 0,5 µg/ml pro flubendazol, robenidin, diclazuril a toltrazuril a o koncentraci 2 µg/ml pro lasalocid A. Výpočet byl proveden pomocí Microsoft Excel. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 – opakovatelnost analýzy

Flubendazol	Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
	1	2,04	24007
	2	2,03	24470
	3	2,03	24072
	4	2,033	24544
	5	2,03	24143
	6	2,03	24558
	N	6	6
	\bar{x}	2,03	24299
	SD	0,00367	251,9825
	RSD (%)	0,18	1,04
Robenidin	Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
	1	3,53	62333
	2	3,50	62706
	3	3,50	62642
	4	3,49	62606
	5	3,48	62708
	6	3,53	62429
	N	6	6
	\bar{x}	3,51	62570
	SD	0,01893	141,461
	RSD (%)	0,54	0,23

Diclazuril	Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
	1	6,46	2843
	2	6,4	2860
	3	6,41	2802
	4	6,38	2845
	5	6,38	2823
	6	6,4	2816
	N	6	6
	\bar{x}	6,41	2831,5
	SD	0,026926	19,61929
	RSD (%)	0,42	0,69
Toltrazuril	Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
	1	7,07	20132
	2	7,03	20154
	3	7,01	20595
	4	7,0	20125
	5	7,0	20194
	6	7,0	20115
	N	6	6
	\bar{x}	7,02	20219
	SD	0,025441	170,023
	RSD (%)	0,36	0,84
Lasalocid A	Číslo pokusu	Retenční čas (t_R) (min)	Plocha píku (A)
	1	9,49	7605
	2	9,49	7741
	3	9,49	7667
	4	9,46	7756
	5	9,46	7688
	6	9,49	7601
	N	6	6
	\bar{x}	9,48	7676
	SD	0,014142	59,88229
	RSD (%)	0,16	0,78

Požadavek $RSD < 1\%$ byl splněn pro hodnocení opakovatelnosti retenčních časů u všech analytů. RSD (%) pro hodnocení opakovatelnosti plochy bylo v rozmezí 0,23 (robenidin) – 1,04 (flubendazol).

5.4.1.2. Rozlišení R_{ij}

Rozlišení jednotlivých píků bylo vyhodnoceno pomocí chromatografického systému.

Hodnoty rozlišení jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Vzorec pro výpočet rozlišení dle ČL 2009 [32]:

$$R_{ij} = 1,18 \left| t_{R2} - t_{R1} \right| / (W_{h2} + W_{h1})$$

t_R = retenční čas složek (min)

W_h = šířka píku na základně (min)

Tabulka č. 3 – rozlišení

Hodnocené látky	rozlišení (R_{ij})
Pík flubendazolu – Pík robenidinu	8,17
Pík robenidinu – Pík diclazurilu	5,67
Pík diclazurilu – Pík toltrazurilu	2,25
Pík toltrazurilu – pík lasalocidu A	5,58

Lékopisný požadavek pro rozlišení je $> 1,5$ [32]. Rozlišení vyhovuje lékopisu. Rozlišení bylo hodnoceno při 245 nm pro všechny analyty.

5.4.1.3. Faktor symetrie píků

Ze tří měření byl pomocí chromatografického softwaru určen faktor symetrie pro jednotlivé píky. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Vzorec pro výpočet faktoru symetrie dle ČL 2009 [32]:

$$A_s = W_{0,01} / 2d$$

$W_{0,01}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky (min)

d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Tabulka č. 4 – faktory symetrie

Analyzovaná látka	Faktor symetrie (A_s)
Flubendazol	1,28
Robenidin	1,34
Diclazuril	1,35
Toltrazuril	1,11
Lasalocid A	1,38

Lékopis požaduje hodnotu faktoru symetrie 0,8 – 1,5 [32]. Zjištěné hodnoty tedy vyhovují lékopisu.

5.4.1.4. Účinnost chromatografické kolony

Zdánlivý počet teoretických pater je průměrem třech měření a byl vypočítán pomocí chromatografického softwaru. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Vzorec pro výpočet zdánlivého počtu teoretických pater dle ČL 2009 [32]:

$$N = 5,54 \cdot (t_R/W_{0,05})^2$$

t_R = retenční čas (min)

$W_{0,05}$ = šířka píku v polovině výšky (min)

Tabulka č. 5 – počet teoretických pater

Analyt	Počet teoret. pater (N)
Flubendazol	2392
Robenidin	4729
Diclazuril	8288
Toltrazuril	10268
Lasalocid A	7515

5.4.2. Částečná validace analytické metody

5.4.2.1. Přesnost

Bylo analyzováno 5 vzorků připravených dle postupu uvedeném v kapitole 4.4.2.3. – Příprava vzorku. Porovnávány byly plochy píků jednotlivých vzorků přepočtené na navážku 5,0 g. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 - přesnost

Vzorek č.	Plocha píku (A)				
	<u>Flubendazol</u>	<u>Robenidin</u>	<u>Diclazuril</u>	<u>Toltrazuril</u>	<u>Lasalocid A</u>
1	23624	47373	2819	19654	7266
2	21332	44556	3264	18285	8157
3	22814	47031	2496	22685	7303
4	20537	39555	2460	19148	7452
5	25350	49148	3198	22825	7476
n	5	5	5	5	5
\bar{x}	22731,4	45532,6	28474,4	20519,4	7530,8
SD	1889,627	3721,184	377,7708	2099,274	361,7149
RSD (%)	8,36	8,17	13,27	10,23	4,80

Závěr: Přesnost byla v rozmezí 4,80 - 13,27% pro jednotlivé analyty.

Přidávané množství standardu ke vzorku při hodnocení parametrů přesnost a správnost odpovídá koncentracím analytů ve vzorku (viz tabulka č. 7):

Tabulka č. 7 – koncentrace analytů ve vzorku

<i>Látka</i>	<i>C (μg/kg masa)</i>	<i>Látka</i>	<i>C (μg/kg masa)</i>
Flubendazol	100	Diclazuril	125
Robenidin	100	Toltrazuril	125
Lasalocid A	400		

5.4.2.2. Správnost

Byl změřen roztok standardu: $c_0 = 0,5 \mu\text{g/ml}$ pro toltrazuril a diclazuril, $0,625 \mu\text{g/ml}$ pro flubendazol a robenidin, $2 \mu\text{g/ml}$ pro lasalocid A. Postup přípravy standardu pro HPLC analýzu je uveden v kap. 4.4.2.2. Byly analyzovány modelové vzorky (placebo – kuřecí prsa + roztok standardu), které byly paralelně připravené postupem uvedeným v kap. 4.4.2.3. - Příprava vzorku.

Výtěžnost (R_i) byla vypočítána podle vzorce [32]:

$$R_i (\%) = 100 \cdot A_i/A_0$$

A_0 = plocha standardu

A_i = plocha stanovená HPLC ve vzorku po úpravě a přidavku roztoku standardů

Tabulka č. 8 – správnost

Flubendazol				Robenidin			
Vzorek č.	n= 4	A _i	R _i (%)	Vzorek č.	n= 4	A _i	R _i (%)
1	100%	23624	98,40	1	100%	47373	76,00
2	odpovídá A _o : 24007	21332	88,86	2	odpovídá A _o : 62333	44556	71,48
3		22814	95,03	3		47031	75,45
4		20537	85,55	4		49148	78,85
		N	6			n	6
		\bar{x}	91,96 %			\bar{x}	75,44%
		SD	5,82			SD	3,03
		RSD	6,33 %			RSD	4,02 %
Diclazuril				Toltrazuril			
Vzorek č.	n= 4	A _i	R _i (%)	Vzorek č.	n= 4	A _i	R _i (%)
1	100%	2819	106,54	1	100%	19654	99,11
2	odpovídá A _o : 2646	2496	94,33	2	odpovídá A _o : 19831	18285	92,20
3		2460	92,97	3		19685	99,26
4		2486	93,95	4		19148	95,56
		N	6			n	6
		\bar{x}	96,95 %			\bar{x}	96,78 %
		SD	6,42			SD	3,30
		RSD	6,62%			RSD	3,40%
Lasalocid A							
Vzorek č.	n= 4	A _i	R _i (%)				
1	100%	7266	95,54				
2	odpovídá A _o : 7605	7303	96,03				
3		7452	97,99				
4		7476	98,30				
		N	6				
		\bar{x}	96,97 %				
		SD	1,38				
		RSD	1,43%				

Závěr: Výtěžnost byla v rozmezí od 75,44% do 96,97%. Pro robenidin byla výtěžnost nižší, ale pro ostatní 4 analyty byla výtěžnost nad 90%.

RSD bylo v rozmezí 1,43% do 6,62%.

5.4.2.3. Detekční a kvantitativní limit

Detekční limit - LOD a kvantitativní limit - LOQ byly stanoveny podle poměru signálu a šumu u vzorků připravených podle kapitoly 4.4.2.3. – Příprava vzorku. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9. – LOD a LOQ pro jednotlivé analyty

	<i>LOQ (µg/kg masa)</i>	<i>LOD (µg/kg masa)</i>
Flubendazol	50	15,15
Robenidin	50	15,15
Diclazuril	125	37,88
Toltrazuril	62,5	18,94
Lasalocid A	400	121,21

Dle sbírky zákonů č. 169/2002 jsou v České republice v krmivech povolená pouze 3 z výše uvedených antikokcidik, a to robenidin, diclazuril a lasalocid A [33]. Toltrazuril a flubendazol jsou využívány v antiparazitické léčbě u prasat, kuřat, krůt, lovného ptactva a domácích šelem [34].

Maximální povolené hodnoty reziduální koncentrace v mase jsou uvedeny v tabulce č. 10 [35].

Tabulka č. 10 – limitní reziduální koncentrace

<i>látka</i>	<i>c (μg/kg masa)</i>
Flubendazol	50
Robenidin	nestanoveno
Diclazuril	nestanoveno
Toltrazuril	100
Lasalocid A	20

Závěr: Tato metoda je vhodná pro stanovení 4 z 5ti výše uvedených antikokcidik, a to pro flubendazol, robenidin, diclazuril a toltrazuril a splňuje podmínky evropské direktivy [35]. Pro lasalocid A nebylo dosaženo dostatečného detekčního limitu pro tuto látku.

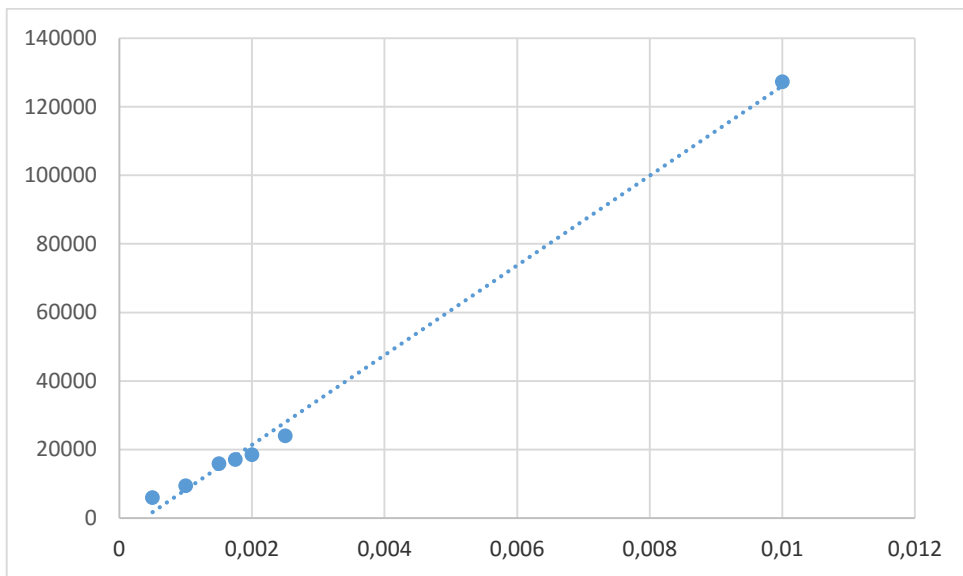
5.4.2.4. Linearita

Bylo připraveno 7 kalibračních roztoků standardů (koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 11). Plocha píku pro každou koncentraci je průměrem z 2 měření. Závislost ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese (viz Graf č. 1-4). Parametry kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce č. 12.

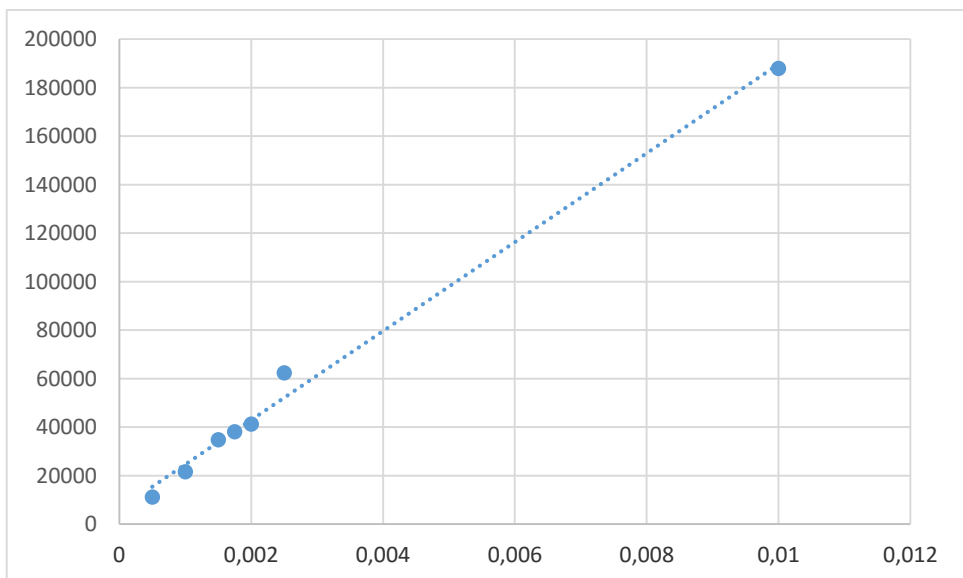
Tabulka č. 11 - linearita

<i>c(μg/ml)</i>	<i>Plocha (A)</i>			
	<i><u>Flubendazol</u></i>	<i><u>Robenidin</u></i>	<i><u>Diclazuril</u></i>	<i><u>Toltrazuril</u></i>
0,0005	5962	11087	1039	2969
0,001	9489	21530	1250	9233
0,0015	15896	34803	1922	12461
0,00175	17140	38047	1782	12082
0,002	18509	41266	2445	14556
0,0025	24007	62333	2646	19831
0,01	127256	187924	7442	65243

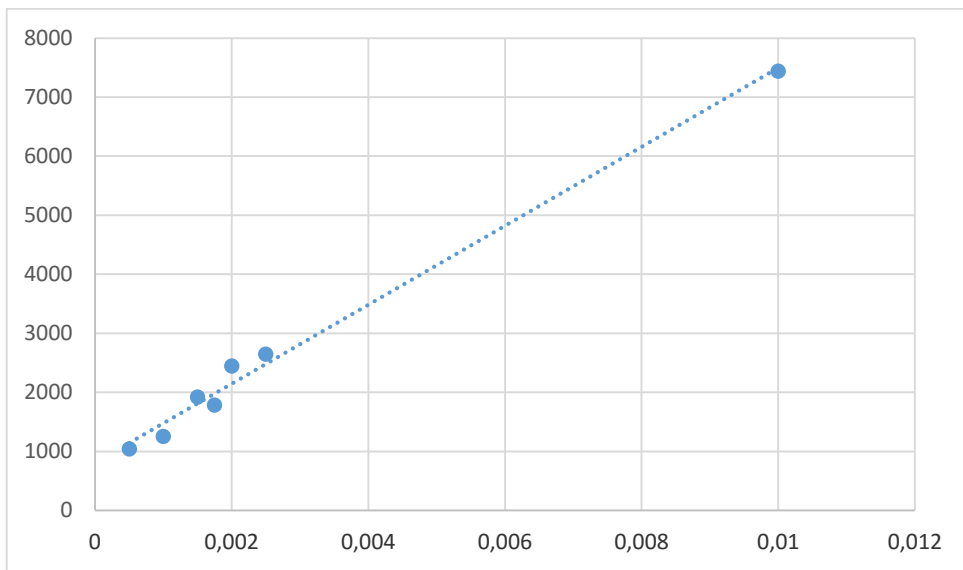
Graf č. 1 – linearita pro flubendazol



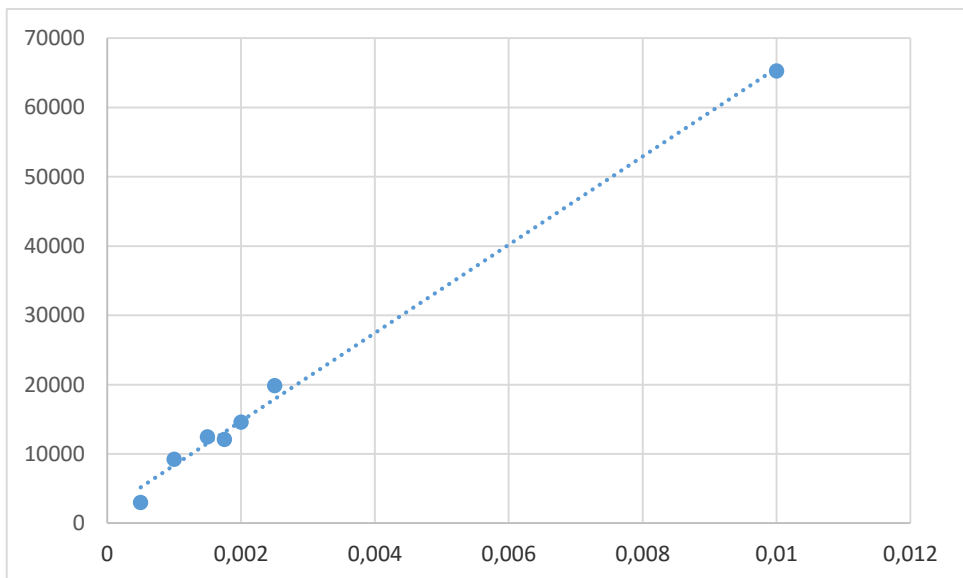
Graf č. 2 – linearita pro robenidin



Graf č. 3 – linearita pro diclazuril



Graf č. 4 – linearita pro toltrazuril



Tabulka č. 12 - parametry kalibrační křivky pro jednotlivé analyty

Regresní funkce : $y = kx + q$		
Počet bodů $n = 7$		
Rovnice přímky		Korelační koeficient
Flubendazol	$y = 1E+07x - 4799,1$	$R^2 = 0,9958$
Robenidin	$y = 2E+07x + 6266$	$R^2 = 0,9935$
Diclazuril	$y = 669268x + 806,08$	$R^2 = 0,9919$
Toltrazuril	$y = 6E+06x + 1975,1$	$R^2 = 0,9956$

Linearita pro lasalocid A bohužel nebyla proměřena neboť v průběhu experimentální části došel standardní roztok lasalocidu A a v průběhu měření nebyl doručen nový.

5.4.2.5. Selektivita

Selektivita byla hodnocena porovnáním chromatogramů obohacených vzorků kuřecího masa a kuřecího masa připravených podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2.3. – Příprava vzorku.

Chromatogramy jsou uvedeny na obrázcích 27 a 28. Ze záznamů je patrné, že při zvolených vlnových délkách nejsou v retenčních časech odpovídajících sledovaným látkám přítomny žádné píky interferujících látek.

6. ZÁVĚR

Byla vyvinuta a částečně validována modifikovaná QuEChERS metoda přípravy vzorku a HPLC metoda pro stanovení vybraných antikocidů (flubendazol, toltrazuril, robenidin, diclazuril a lasalocid A).

Metoda přípravy vzorku byla optimalizována. Vzorek byl připraven modifikovanou metodou QuEChERS zahrnující extrakci acetonitrem v přítomnosti malého množství vody. Jako sušidlo byla použita kombinace solí síranu sodného a chloridu sodného a byl vynechán krok přečištění pomocí disperzní SPE.

Jako vhodná stacionární fáze byla vybrána analytická kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl (4,6 x 100 mm, 2,7 μ m) a jako mobilní fáze 0,1% FA pH 4 (pH upraveno triethylaminem) – ACN (50:50, v/v), průtok 0,8 ml/min, kolonový prostor byl vyhříván na teplotu 30 °C a na kolonu byl nastříkán objem 20 μ l vzorku. Celkový čas analýzy činil 15 minut za UV detekce při 245 nm pro 3 analyty a 310 nm pro robenidin a lasalocid A.

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému (SST), zahrnující následující parametry: opakovatelnost analýzy (RSD u opakovatelnosti retenčních časů < 1%, u opakovatelnosti pro plochy píků byla RSD v rozmezí od 0,23% do 1,04%); rozlišení (> 1,5); faktor symetrie (0,8 - 1,5) a účinnost chromatografické kolony pro jednotlivé analyty a také validace metody, zahrnující parametry: přesnost (RSD v rozmezí 4,80 - 13,27%), správnost (RSD v rozmezí 1,43% - 6,62%), linearitu ($r^2 > 0,99$) a selektivitu.

Detekční a kvantitativní limity (LOQ = 50 – 400 μ g/kg masa, LOD = 15,15 – 121,21 μ g/kg masa) ukázaly, že metoda je vhodná ke stanovení koncentrace reziduí vybraných antikocidů ve vzorcích kuřecího masa a splňuje limity evropské direktivy pro 4 z 5 analytů – vyjma lasalocidu A, kde nebylo dosaženo dostatečně nízkého detekčního limitu.

7. SEZNAM ZKRATEK

AA – kyselina octová

ACN – acetonitril

DMSO – dimethylsufoxid

FA – kyselina mravenčí

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

H₂O – voda

LOD – detekční limit

LOQ – kvantitativní limit

MeOH – methanol

Mg₂SO₄ – síran hořečnatý

MS – hmotnostní spektrometrie

NaAc – octan sodný

NaCl – chlorid sodný

Na₂SO₄ – síran sodný

PSA – primární sekundární amin

RSD – relativní směrodatná odchylka

SPE – extrakce pevným sorbentem

SST – test vhodnosti chromatografického systému

TFAA – kyselina trifluoroctová

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PLÍŠEK, K., *Současná a perspektivní antikokcidika u drůbeže*. Praha: Merkur, 1987.
- [2] MEHLHORN, H., *Encyclopedia of parasitology*. 3rd ed. Berlin: Springer, c2008. ISBN 978-3-540-48994-8.
- [3] EMEA, *Committee for veterinary medicinal product diclazuril summary report (1)*, 4.1996. Dostupné z www.ema.europa.eu
- [4] DUCHÁČEK, L. a LAMKA, J., *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. 2., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2792-2.
- [5] PubChem, *Khimkoktside | C15H13Cl2N5 – PubChem* [online], aktualizováno 16.4.2016 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9570438
- [6] DORNE, J.L., et al., *Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 270(3): p. 196-208.
- [7] PubChem, *Lasalocid A Sodium | C34H53NaO8 - PubChem* [online], aktualizováno 16.4.2016 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6426773
- [8] PATOČKA, J., *Lasalocid: kokcidostatikum toxické i pro nečlívové organismy* [online], vystaveno 1.4.2013 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z toxicology.cz/modules.php
- [9] PubChem, *Flubendazole | C16H12FN3O3 – PubChem* [online], aktualizováno 16.4.2016 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/35802
- [10] *Flubendazole | C16H12FN3O3 | ChemSpider* [online], [cit. 2016-04-22]. Dostupné z www.chemspider.com/Chemical-Structure.32932.html
- [11] Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, *CliniPharm Wirkstoffdaten: Flubendazol* [online], [cit. 2016-04-23]. Dostupné z www.vetpharm.uzh.ch/WIR/00003143/0156__F.htm
- [12] PubChem, *DICLAZURIL | C17H9Cl3N4O2 – PubChem* [online], [cit. 2016-04-22]. Dostupné z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456389

- [13] *Diclazuril* | *CasNO.101831-37-2* [online], [cit. 2016-04-23]. Dostupné z www.lookchem.com/Diclazuril/
- [14] *Diclazuril* | *C17H9Cl3N4O2* | *ChemSpider* [online], [cit. 2016-04-23]. Dostupné z www.chemspider.com/Chemical-Structure.401855.html
- [15] PubChem, *Toltrazuril* | *C18H14F3N3O4S* – *PubChem* [online], [cit. 2016-04-22]. Dostupné z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68591
- [16] *Toltrazuril* | *C18H14F3N3O4S* | *ChemSpider* [online], [cit. 2016-04-24]. Dostupné z <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.61859.html>
- [17] BAYER, *Baycox (toltrazuril) 5% Oral Suspension (Canada) for Animal Use - Drugs.com* [online], aktualizováno 16.4.2014 [cit. 2016-04-23]. Dostupné z www.drugs.com/vet/baycox-toltrazuril-5-oral-suspension-can.html
- [18] Löscher, W., F.R. Ungemach, and R. Kroker, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 2006: Parey
- [19] EMEA, *Committee for veterinary medicinal product toltrazuril summary report (1)*, 4.1998. Dostupné z www.ema.europa.eu
- [20] COHEN, H., et al., *Sensitive fluorescence detection of robenidine by derivatization with dansyl chloride and high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1995, 694(2), p: 407-413.
- [21] DOWING, G., et al., *Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection*. *Analytica Chimica Acta* 2005, 539 (1-2), p: 31-34.
- [22] DOUŠA, M., *HPLC stanovení robenidinu v krmivech*, *Chem.Listy* 2005, 99, p: 509-514
- [23] WILGA, J., et al., *Coparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples*. *Talanta* 2007, 73(5), p: 812-819.
- [24] JEREZ, A., et al., *Development and validation of an HPLC method to determine lasalocid in raw milk samples from diary cows*. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 2013, 23(6), p: 537-542.

- [25] DUSI, G., et al., *Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005, 38, p: 375-379.
- [26] MORTIER, L., et al., *Determination of the coccidiostat diclazuril in poultry feed and meat by liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 2005, 529, p: 229-234.
- [27] ZHENG, W., et al., *Simultaneous determination of toltrazuril and its metabolites in chicken and pig skin + fat by UPLC-UV method*. Journal of Chromatography B, 2014, 972, p: 89-94.
- [28] QuEChERS [online], cit. [2016-04-29]. Dostupné z quechers.cvua-stuttgart.de
- [29] ANASTASSIADES, M., et al., *Validation of Simple and Rapid Multiresidue Method (QuEChERS) and its Implementation in Routine Pesticide Analysis*. MGPR Symposium 2003. Dostupné z quechers.cvua-stuttgart.de
- [30] MAJORS, R. E., *QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples*. LCGC Asia Pacific, 2008, 11(1). Dostupné z www.chromatographyonline.com
- [31] DÍEZ, C., et al., *Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples*. Journal of Chromatography A, 2006, 1131(1-2), p: 11-23.
- [32] *Český lékopis 2009*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [33] *Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů*. Sbírka zákonů Česká republika, 2002, částka 71, p: 3566.

- [34] BÁRTÍKOVÁ, H.; KŘÍŽOVÁ, V.; LAMKA, J.; KUBÍČEK, V.; SKÁLOVÁ, L.; SZOTÁKOVÁ, B. *Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis*. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33, 2009, 56-62.
- [35] *COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*. *Official Journal of the European Union*, 2010, p: L 15/26-L 15/67.