

31993L0117

L 329/54

ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ

30.12.1993

ДВНАДЕСЕТА ДИРЕКТИВА 93/117/ЕО НА КОМИСИЯТА
от 17 декември 1993 година
относно установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

Член 2

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ⁽¹⁾, последно изменена с Регламент (ЕИО) 3768/85 ⁽²⁾, и по-специално член 2 от нея,

Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими за да се съобразят с настоящата директива преди 30 ноември 1994 г. и незабавно информират Комисията за това.

като има предвид, че Директива 70/373/ЕИО изисква с оглед спазване на изискванията, произтичащи от разпоредбите за качество и състав, определени от закони, подзаконови и административни разпоредби, официалният контрол върху фуражите да се осъществява, като се използват методите на Общността за анализ и проба;

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

като има предвид, че методи за анализ на Общността за фуражи добавките робенидин и methyl benzoquate трябва да се въведат в процеса на съблюдаване на съответствието с условията за тяхното използване в фуражите;

Член 3

като има предвид, че мерките, предвидени от настоящата директива са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

Настоящата директива влиза в сила на третия ден след датата на публикуването ѝ в Официален вестник на Европейските общности.

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Съставено в Брюксел на 17 декември 1993 година.

Член 1

Държавите-членки изискват анализите, провеждани в хода на официалните проверки на фуражи с цел идентифициране на съдържанието на робенидин и methyl benzoquate в тях, да се осъществяват на основата на методите, описани в приложението към настоящия документ.

За Комисията

René STEICHEN

Член на Комисията

⁽¹⁾ ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

⁽²⁾ ОВ L 362, 31.12.1985 г., стр. 8.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РОБЕНИДИН

1.3-bis[(4-chlorobenzylidene)amino] guanidine-hydrochloride

1. Цели и обхват

Този метод се използва за определяне съдържанието на робенидин в храните за животни, като долната граница на определяне е 5 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се екстрахира с помощта на кисел метанол. Екстрактът се изсушава, след което аликвотна част от него се подлага на изчистване в колона с алуминиев окис. Robenidine се елуира от колоната с метанол. След като се концентрира, към него се добавя ново количество, за да се постигне подходящият за мобилната фаза обем. Съдържанието на robenidine се определя чрез обратнофазова течна хроматография (HPLC) с много високи работни характеристики на базата на ултравиолетов детектор.

3. Реактиви

3.1. Метанол

3.2. Кисел метанол

Слагат се 4 ml солна киселина (P20c 1,18g/ml) в 500 ml градуирана колба. Напълва се с метанол до определената черта (3.1) и се разбърква. Разтворът се приготвя непосредствено преди употреба;

3.3. Ацетонитрил, HPLC степен

3.4. Молекулярно сито

Тип 3A с 8 до 12 мрежести отвора (1,6-2,5 mm отвори, кристален алумино силикат, диаметър на порите 0,3 mm)

3.5. алуминиев окис: I степен на киселинна реакция за колонна хроматография

100 g алуминиев окис се прехвърлят в подходящ съд и се прибавят 2,0 ml вода. Запушва се и се разклаща за приблизително 20 min. Така полученият разтвор се съхранява в добре запушен съд.

3.6. Разтвор на калиев дихидрогенен фосфат, $c = 0.025 \text{ mol/l}$

3,40 g калиев дихидрогенен фосфат се разтварят във вода (HPLC степен) в 1000 ml градуирана колба. Допълва се до определената черта и се разбърква.

3.7. Разтвор на двунатриев хидрогенен фосфат, $c = 0.025 \text{ mol/l}$

3,55 g безводен двунатриев хидрогенен фосфат (или 4,45 g дихидрат или 8,95 g от додекахидрат) се разтварят във вода (HPLC степен) в 1000-милиметрова колба. Допълва се до определената черта и се разбърква.

3.8. HPLC подвижна/мобилна фаза

Смесват се следните реактиви:

650 ml ацетонитрил (3.3),

250 ml вода (HPLC степен),

50 ml разтвор на калиев дихидрогенен фосфат (3.6),

50 ml разтвор на двунатриев хидрогенен фосфат (3.7).

През 0,22 μm филтър се прецежда (4.6) и се дегазира разтворът (например чрез ултрасонификация за 10 min).

3.9. Стандартна субстанция

Чист робенидин: 1.3-bis[(4-chlorobenzylidene)amino] guanidine hydrochloride, E 750.

3.9.1. Изходен стандартен разтвор на робенидин: 300 µg/ml:

Отмерват се 30 mg от стандартния робенидинов разтвор (3.9) до най-близките 0,1 mg на колбата. Разтваря се в кисел метанол (3.2) в 100 ml градуирана колба. Допълва се до определената черта със същия разтворител и се разбърква. Колбата се увива в алуминиево фолио и се поставя на тъмно място.

3.9.2. Междинен стандартен разтвор на робенидин: 12 µg/ml

10,0 ml от изходния стандартен разтвор се слагат (3.9.1) в 250 ml градуирана колба. Допълва се до количеството, необходимо за подвижната фаза, и се разбърква. Колбата се увива с алуминиево фолио и се съхранява на тъмно място;

3.9.3. калибрационни разтвори - 5, 10, 15 и 20 и 25 ml от междиния стандартен разтвор се прехвърлят (3.9.2) в няколко 50 ml калибрирани колби. Допълват се до количеството, необходимо за подвижната фаза (3.8) и се разбъркват. Разтворите отговарят съответно на 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 и 6,0 µg/ml робенидин. Разтворите се приготвят непосредствено преди употреба.

4. Апаратура

4.1. Стъклена колона

Направена е от тъмно кехлибарено стъкло, снабдено със запорен кран. Резервоарът е приблизително с обем 150 ml, вътрешен диаметър от 10 до 15 mm и дължина 250 mm.

4.2. Лабораторен механичен шейкър

4.3. Вакумен ротационен изпарител на филта

4.4. HPLC апарат с ултравиолетов детектор с променлива дължина на вълните или диодно-клетъчен детектор, който работи в обхват 250 – 400 nm

4.4.1. Течна хроматографска колона: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm опаковка или еквивалент

4.5. Филтрова хартия със стъклени нишки (Whatman GF/A или еквивалент)

4.6. Мембранни филтри, 0,22 µm

4.7. Мембранни филтри, 0,45 µm

5. Процедура

Забележка: Робенидинът е чувствителен към светлина. Да се използват тъмнокехлибарени стъкленици във всички операции.

5.1. Общи положения

5.1.1. Необходимо е да се анализира празна проба с цел да се провери наличието на робенидин или интерфериращи вещества.

5.1.2. Необходимо е да се проведе възстановителен тест, като се анализира празната проба (5.1.1.), която е била усилена от допълнително количество робенидин, сходно с това в пробата. Пробата може да бъде усилена до ниво 60, mg/kg като се изхвърлят 3,0 ml от изходния стандартен разтвор в отдена 250-милилитрова конична колба. Разтворът се изпарява до 0,5 ml под азотна струя. Прибавят се 15 g от празната проба, смесва се добре и се изчаква 10 min, преди да се продължи с етапа на екстракция (5.2).

Забележка: за целите на метода празната хранителна проба трябва да бъде сходна по вид с образеца и при анализ не трябва да се открие наличието на робенидин в нея.

5.2. Екстракция

Отмерват се приблизително 15 g от приготвения образец до най-близките 0,01 g. Прехвърлят се в 250 ml колба и се добавят 100 ml кисел метанол (3.2), съдът се запущва добре и се бърка в шейкър в продължение на 1 h (4.2). Разтворът се прецежда през филтрова хартия със стъклени нишки (4.5) и целият филтрат се събира в 150 ml конична колба. Прибавят се 7,5 g от молекулярно сито (3.4), съдът се запущва добре и се разбива в продължение на 5 min. Незабавно се прецежда през филтрова хартия със стъклени нишки. Разтворът се запазва за етапа на пурификация (5.3).

5.3. Пурификация

5.3.1. Подготовка на колоната с алуминиев окис

Долният край на стъклената колона се запушва (4.1) с тапа от стъклен памук и се уплътнява, като тапата се набутва навътре с помощта на стъклена пръчка. Отмерват се 11 g от приготвения алуминиев окис (3.5) и се прехвърлят в колоната. По време на опита влиянието на околната среда трябва да се сведе до минимум. Колоната се почуква леко в долния ѝ край, за да се избистри окисът.

5.3.2. Пурификация на пробата/образеца

Прехвърлят се 5 ml от пробния екстракт, приготвен в (5.2), в колоната с помощта на пипета. Краят на пипетата се поставя близо до колонната стена и се оставя разтворът да се абсорбира от алуминиевия окис. Робенидинът от колоната се елюира, като се използват 100 ml метанол (3.1) при скорост на изтичане 2 до 3 ml/min. Елюираната субстанция се поставя в 250 ml колба с кръгло дъно. Метаноловият разтвор се подлага на изпаряване до изсъхване при намалено налягане от 40 (градуса по Целзий) във вакуумен ротационен филмов изпарител (4.3). Утайката се разтваря отново в 3 до 4 ml субстанция от подвижната фаза (3.8) и се прехвърля в 10 ml колба. Колбата се изплаква на няколко пъти с 1 до 2 ml от подвижната фаза и изплакнатите количества се прехвърлят в градуираната колба. Допълва се до определената черта със същия разтворител и се разбърква. Една аликвотна част от полученото вещество се филтрира през мембранни филтри 0,45 µm (4.7). Разтворът се запазва за определяне на HPLC (5.4).

5.4. Определяне на HPLC

5.4.1. Параметри

Предлагат се следните условия за провеждане на анализа. Други условия могат да бъдат използвани, ако те дават равностойни резултати:

- течна хроматографична колона (4.4.1),
- HPLC подвижна фаза (3.8),
- скорост на изтичане: 1,5 до 2 ml (min),
- вълнова дължина на детектора: 317 nm,
- обем за инжектиране: 20 до 50 µl.

Проверява се стабилността на хроматографичната система, като на няколко пъти се инжектира калибрационен разтвор (3.9.1), съдържащ 3,6 µg/ml, докато се постигнат постоянни височини на пика и времена на задържане.

5.4.2. Калибрационна графика

Всеки от калибрационните разтвори, получени в (3.9.3), се инжектира няколко пъти и се измерват височините (областите на пика) за всяка концентрация. Начертава се калибрационна крива, като се обозначават средните пикови височини или области на калибрационните разтвори по ординатите, а съответните концентрации в µg за ml по абсцисите.

5.4.3. Мострен разтвор

Мостреният разтвор се инжектира няколко пъти, като се използва същият обем като този в калибрационните разтвори и се определя средната пикова височина (област) на робенидиновите пикове.

6. Изчисление на резултатите

От средната височина (област) на робенидиновите пикове се определя концентрацията на мострения разтвор в µg/ml на базата на калибрационната графика (5.4.2).

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

където

c = концентрацията на робенидин в мострения разтвор в µg/ml,

m = масата на тестовата позиция в g.

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография или използването на диоден детектор, с помощта на който могат да се сравнят спектрите на мострения екстракт и калибрационния разтвор (3.9.3), съдържащ 6 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматография

Пробният екстракт се подсилва, като към него се прибави подходящо количество от калибрационния разтвор (3.9.3). Количеството добавен робенидин трябва да бъде сходно с количество робенидин, изчислено в пробния екстракт.

Усилва се единствено височината на робенидиновия пик, като се вземе предвид както добавеното количество, така и разтвореният екстракт. Пиковата широчина в половината от максималната му височина трябва да бъде в приблизително 10 % от началната широчина.

7.1.2. Диодно детектиране

Резултатите са оценени съгласно следните критерии:

- a) вълновата дължина на максималната абсорбция на пробата и стандартните спектри, регистрирана в пиковия апекс на хроматограмата трябва да попадне в същото поле на разделителната сила на детектиращата система. Що се отнася до диодния детектор, типично за него е да бъде приблизително в обсега на 2 nm;
- b) в обсега между 250 и 400 nm пробата и стандартните спектри, регистрирани в пиковия апекс на хроматограмата, не трябва да се различават от онези части на спектъра, които попадат в обсег 10 до 100 % от относителната абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато налице са същите максимуми и няма регистрирана точка, в която отклонението между двата спектра да превишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ;
- в) в обсега между 250 и 400 nm спектрите на възходящия наклон, апекса и низходящ наклон на пика, регистриран от острия екстракт, не трябва да се различават един от друг за тези части от спектъра, които попадат в обсега на 10 до 100 % от относителната абсорбция. Критерият е спазен тогава, когато налице са същите максимуми и когато във всички регистрирани точки отклонението между спектрите не надминава 15 % от абсорбцията на спектъра на апекса.

Ако един от критерията не е спазен, то наличието на анализа не се потвърждава.

7.2. Повтаряемост

Разликата между резултатите от двата паралелно проведени опита за определяне на робенидиновото съдържание в една и съща проба не трябва да превишава 10 % от по-високата стойност за робенидиново съдържание, по-голямо от 15 mg/kg.

7.3. Възстановяване

Възстановяването за подсилена празна хранителна проба трябва да бъде поне 85 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Общността организира съвместно изследване, проведено от 12 лаборатории. Предмет на анализ са четири фуражни проби от храната на домашни птици и зайци във формата на шрот или гранули. Всяка проба е била подложена на двоен анализ. Резултатите от изследването са дадени в долната таблица:

| | Домашни птици | | гранули | |
|----------------------|---------------|-------|---------|---------|
| | Зайци | шрот | шрот | гранули |
| Средна (mg/kg) | 27,00 | 27,99 | 43,6 | 40,1 |
| S1 (mg/kg) | 1,46 | 1,26 | 1,44 | 1,66 |
| CV1 (%) | 5,4 | 4,5 | 3,3 | 4,1 |
| S1 (mg/kg) | 4,36 | 3,36 | 4,61 | 3,91 |
| CVR (%) | 16,1 | 12,0 | 10,6 | 9,7 |
| Възстановя- ване (%) | 90,0 | 93,3 | 87,2 | 80,2 |

S1 - стандартно отклонение на повторяемост

CV1 - коефициент на вариация на повторяемостта

SR - стандартно отклонение на възпроизводимост

CVR - коефициент на вариация на възпроизводимостта

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА METHYL BENZOQUATE**7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone****1. Цели и обхват**

Този метод се използва за определяне съдържанието на methyl benzoate във фуражите, като долната граница на определяне е 1 mg/kg.

2. Принцип

Метилният benzoate се екстрахира от пробата с помощта на метанолова метаносулфонова киселина. Екстрактът се пречиства с дихлорметан чрез йоннообменна хроматография и после отново с дихлорметан. Съдържанието на метилния benzoate се определя чрез обратнофазова течна хроматография (HPLC) с много високи работни характеристики на базата на ултравиолетов детектор.

3. Реактиви

3.1. Дихлорметан

3.2. Метанол, HPLC степен

3.3. HPLC подвижна фаза:

Смес от метанол (3.2) и вода (HPLC степен) 75 + 25 (v + v).

Разтворът се прецежда през филтър 0,22µm (4.5) и се дегазира (напр. чрез ултрасонификация в продължение на 10 min);

3.4. Разтвор на метаносулфонова киселина, s = 2 %

Метаносулфовата киселина и метанолът се разреждат в съотношение 20 ml към 1000 ml (3.2); Разтвор на солна киселина, s = 10 %

3.5. разтвор на солна киселина, s = 10 %

Солната киселина (P20 с 1,18 g/ml) се разрежда с вода в съотношение 100 ml към 1000 ml;

3.6. Катионнообменна смола Amberlite CG-120 (Na), 100 до 200 мрежа

Смолата се подлага на обработка преди употреба - суспендират се 100 g от смолата и 500 ml разтвор на солна киселина (3.5), нагрява се на горещ котлон до завиране, като непрекъснато се бърка. Остава се да се охладят и киселината се източва. Прецежда се през филтрова хартия във вакуум. Смолата първо се измива с 500 ml дози вода два пъти, а след това и с 250 ml метанол. Смолата се изплаква с още 250 ml метанол и се изсушава, като се пуска въздух през филтър-преса. Изсушената смола се съхранява в добре запушена бутилка;

3.7. Стандартна субстанция: чист methyl benzoate (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolone);

3.7.1. Изходен стандартен разтвор на methyl benzoate, 50 µg/ml

Отмерват се 50 mg от стандартната субстанция (3.7) с точност до 0,1 mg и се разтварят в разтвор на метаносулфонова киселина (3.4) в 100 ml градуирана колба. Допълва се до определената черта и се разбърква.

3.7.2. Междинен стандартен разтвор на methyl benzoate, 50 µg/ml

Прехвърлят се 5 ml от изходния стандартен разтвор на methyl benzoate (3.7.1) в 50 ml градуирана колба. Допълва се с метанол (3.2) до определената черта и се разбърква.

3.7.3. Калибрационни разтвори

Прехвърлят се 1, 2, 3, 4 и 5 ml от междинния стандартен разтвор на methyl benzoate (3.7.2) в няколко 25 ml градуирани колби. Допълва се до определения за подвижната фаза (3.3) обем и се разбърква. Концентрацията на methyl benzoate в тези разтвори е съответно 2, 4, 6, 8 и 10 µg/ml. Разтворите се приготвят непосредствено преди употреба.

4. Апаратура

4.1. Лабораторен шейкър

- 4.2. Вакуумен ротационен изпарител на филта
- 4.3. Стъклена колона (250 mm × 15 mm), снабдена със запорен кран. Резервоарът е с обем 200 ml приблизително.
- 4.4. HPLC апарат с ултравиолетов детектор с променлива дължина на вълните или диоден детектор
- 4.4.1. Течна хроматографска колона: 300 mm × 4 mm, C18, 10 μm опаковка или еквивалент;
- 4.5. Мембранни филтри, 0,22 μm
- 4.5. Мембранни филтри, 0,22 μm

5. Процедура

- 5.1. Общи положения
- 5.1.1. Анализира се празна фуражна проба с цел да се провери отсъствието както на methyl benzoquate, така и на интерфириращи вещества.
- 5.1.2. Провежда се възстановителен тест, като се анализира празната проба, която предварително е била усилена чрез прибавяне на допълнително количество methyl benzoquate, сходно с количеството в пробата. Пробата може да бъде усилена до ниво до 15 mg/kg, като се прибавят 600 μl от изходния стандартен разтвор (3.7.1) към 20 g от празната проба. Смесва се и се изчаква 10 min, преди да се продължи с етапа на екстракция (5.2).

Забележка: За целите на метода празната проба трябва да бъде сходна по вид с образца и при анализ не трябва да се открие наличието на methyl benzoquate.

5.2. Екстракция

Отмерват се приблизително 20 g от приготвената проба до най-близкия 0,01 g и се прехвърлят в 250 ml конична колба. Прибавят се 100 ml разтвор на метаносулфонова киселина (3.4) и се разбива механично в продължение на 30 min. Филтрира се през филтърна хартия и филтратът се запазва за етапа на разреждане течност-течност (5.3).

5.3. Разреждане течност-течност

Прехвърлят се 100 ml солна киселина (3.5) и 250 ml от филтратата, получен в (5.2), в 500 ml делителна фуния. Прибавят се 100 ml дихлорметан (3.1) във фунията и се разбива за около 1 min. Оставят се пластове да се разделят и се източва долният пласт (дихлорметан) в 500 ml колба с кръгло дъно. Екстракцията на водната фаза се повтаря с още две 40 ml дози дихлорметан и се смесва с първия екстракт от колбата с кръглото дъно. Дихлорметановият екстракт се подлага на изпаряване до изсъхване във вакуумния ротационен изпарител, работещ при намалено налягане и при 40 (градуса по Целзий). Утайката се разтваря в 20 до 25 ml метанол (3.2), колбата се запушва и се запазва целият екстракт за йоннообменната хроматография (5.4).

5.4. Йоннообменна хроматография

5.4.1. Приготвяне на катионнообменната колона

Запушва се долният край на стъклената колона (4.3) с тапа от стъклен памук. Приготвя се суспензия с 5 g от катионнообменно обработената смола (3.6) и 50 ml солна киселина (3.5). Тя се излива в стъклената колона и суспензията се оставя да се избистри. Източва се излишното количество киселина до нивото на повърхността на смолата и се промива колоната с вода, докато източеното вещество стане неутрално към лакмуса. Прехвърлят се 50 ml метанол (3.2) в колоната и се оставя да се отцеди до нивото на смолистата повърхност.

5.4.2. Колонна хроматография

С помощта на пипета внимателно се прехвърля екстрактът, получен в (5.3), в колоната. Колбата с кръгло дъно се изплаква с две дози (от 5 до 10 ml) метанол (3.2) и изплакнатите количества се прехвърлят в колоната. Екстрактът се източва до нивото на смолата и колоната се измива с 50 ml метанол, като скоростта на изтичане е не по-голяма от 5 ml на min. Източеното количество се изхвърля. Methyl benzoquate от колоната се елюира, като се използва 150 ml разтвор на метаносулфонова киселина (3.4) и се поставя колонният елюат в 250 ml конична колба.

5.5. Разреждане течност-течност

Елюатът, получен в (5.4.2), се прехвърля в 1 l делителна фуния. Коничната колба се изплаква с 5 до 10 ml метанол (3.2) и се смесват изплакнатите количества със съдържанието от делителната фуния. Прибавят се 300 ml разтвор на солна киселина (3.5) и 130 ml дихлорметан (3.1). Разбива се за около 1 min и се оставя фазите да се разделят. Долният слой (дихлорметан) се източва в 500 ml колба с кръгло дъно. Екстракцията на водната фаза се повтаря с още две дози по 70 ml дихлорметан и се смесват новополучените екстракти с първия екстракт от колбата с кръгло дъно.

Дихлорметановият екстракт се подлага на изпаряване до изсъхване във вакуумния ротационен изпарител (4.2), работещ при намалено налягане и при 40 (градуса по Целзий). Утайката се разтваря в колбата с приблизително 5 ml метанол (3.2) и количествено разтворът се прехвърля в 10 ml градуирана колба. Колбата с кръгло дъно се изплаква с още две дози метанол (1 до 2 ml) и съдържанието се прехвърля в градуираната колба. Допълва се с метанол до определената черта и се разбърква. Една аликвотна част се филтрира през мембранен филтър (4.6). Разтворът се запазва за определяне на HPLC (5.6).

5.6. Определяне на HPLC

5.6.1. Параметри

Предлагат се следните условия за провеждане на анализа. Други условия могат да бъдат използвани, ако те дават равностойни резултати:

- течна хроматографична колона (4.4.1);
- HPLC подвижна фаза: метанолово-водна смес (3.3);
- скорост на изтичане: 1 до 1,5 ml (min);
- вълнова дължина на детектора: 265 nm;
- обем за инжектиране: 20 до 50 µl.

Проверява се стабилността на хроматографичната система, като на няколко пъти се инжектира калибрационният разтвор (3.7.3), съдържащ 4 µg/ml, докато се постигнат постоянни височини на пика и времена на задържане.

5.6.2. Калибрационна графика

Всеки от калибрационните разтвори, получени в (3.7.3), се инжектира няколко пъти и се измерват височините (областите) на пика за всяка концентрация. Начертава се калибрационна крива, като средните пикови височини или области на калибрационните разтвори се обозначават по ординатите, а съответните концентрации в mg за ml-по абсцисите.

5.6.3. Мострен разтвор

Мостреният разтвор (5.5) се инжектира няколко пъти, като се използва същият обем като този в калибрационните разтвори и се определя средната пикова височина (област) на methyl benzoquate пикове.

6. Изчисление на резултатите

От средната височина (област) на пиковете на methyl benzoquate се определя концентрацията на мострения разтвор в mg/ml, като се използва калибрационната графика (5.6.2).

Съдържанието на methyl benzoquate w (mg/kg) в пробата е дадена в следната формула:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

където:

c - концентрацията на methyl benzoquate в мострения разтвор в µg/ml;

m -масата на тестовата позиция в g.

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография или чрез използване на диоден детектор, с помощта на който могат да се сравнят спектрите на мострения екстракт и калибрационния разтвор (3.7.3), съдържащ 10 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматография

Пробният екстракт се подсилва, като към него се прибави подходящо количество от междинния стандартен разтвор (3.7.2). Количеството добавен methyl benzoquate трябва да бъде сходно с количество methyl benzoquate, изчислено в пробния екстракт.

Усилва се единствено височината на methyl benzoquate пик, като се вземат предвид както добавеното количество, така и разтвореният екстракт. Пиковата широчина в половината от максималната му височина трябва да бъде в приблизително 10 % от началната широчина.

7.1.2. Диодно детектиране

Резултатите са оценени според следните критерии:

- а) вълновата дължина на максималната абсорбция на пробата и стандартните спектри, регистрирана в пиковия апекс на хроматограмата, трябва да попадне в същото поле на разделителната сила на детектиращата система. Що се отнася до диодния детектор, типично за него е да бъде приблизително в обсега на 2 nm;
- б) в обсега между 220 и 350 nm пробата и стандартните спектри, регистрирани в пиковия апекс на хроматограмата, не трябва да се различават от онези части на спектъра, които попадат в обсерг 10 до 100 % от относителната абсорбция. Критерият е изпълнен тогава, когато налице са същите максимуми и няма регистрирана точка, в която отклонението между двата спектра да превишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ;
- в) в обсега между 220 и 350 nm спектрите на възходящия наклон, апекса и низходящ наклон на пика, регистриран от мострения екстракт, не трябва да се различават един от друг за тези части от спектъра, които попадат в обсега на 10 до 100 % относителната абсорбция. Критерият е спазен тогава, когато налице са същите максимуми и когато във всички регистрирани точки отклонението между спектрите не надминава 15 % от абсорбцията на спектъра на апекса.

Ако един от критериите не е спазен, то наличието на анализа не се потвърждава.

7.2. Повтаряемост

Разликата между резултатите от двата паралелно проведени опита за определяне на methyl benzoquate съдържание в една и съща проба не трябва да превишава: 10 % спрямо по-високата стойност на съдържание на methyl benzoquate, между 4 и 20 mg/kg.

7.3. Възстановяване

Възстановяването за подсилена празна хранителна проба трябва да бъде поне 90 %.

8. Резултати от съвместно изследване

Пет проби се подлагат на анализ от 10 лаборатории. За всяка една проба са проведени двойни анализи. Резултатите са представени в таблицата:

Резултати

| | Празна проба | Шрот 1 | Гранули 1 | Шрот 2 | Гранули 2 |
|----------------------|--------------|--------|-----------|--------|-----------|
| Средна (mg/kg) | n.d. | 4,50 | 4,50 | 8,90 | 8,70 |
| S1 (mg/kg) | n.d. | 0,30 | 0,20 | 0,60 | 0,50 |
| CV1 (%) | n.d. | 6,70 | 4,40 | 6,70 | 5,70 |
| S1 (mg/kg) | n.d. | 0,40 | 0,50 | 0,90 | 1,00 |
| CVR (%) | n.d. | 8,90 | 11,00 | 10,10 | 11,50 |
| Възстановя- ване (%) | n.d. | 92,00 | 93,00 | 92,00 | 89,00 |

n.d. - не е открито

S1 - стандартно отклонение на повторяемост

CV1 - коефициент на вариация на повторяемостта

SR - стандартно отклонение на възпроизводимост

CVR - коефициент на вариация на възпроизводимостта