

31999L0027

L 118/36

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

6.5.1999

SMĚRNICE KOMISE 1999/27/ES

ze dne 20. dubna 1999,

kteřou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení amprolia, diclazurilu a carbadoxu v krmivech, mění směrnice 71/250/EHS a 73/46/EHS a zrušuje směrnice 74/203/EHS

(Text s významem pro EHP)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

silici a theobromin; že s ohledem na vědecko-technický pokrok nejsou popsané metody již vhodné pro zamýšlený účel, a proto je třeba je zrušit;

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970, kterou se zavádí metody odběru vzorků a analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽¹⁾, naposledy pozměněnou Aktem o přistoupení Rakouska, Finska a Švédska, a zejména na článek 2 této směrnice,

(5) vzhledem k tomu, že čtvrtou směrnicí Komise 73/46/EHS ze dne 5. prosince 1972, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽⁷⁾, naposledy pozměněnou směrnicí 98/54/ES, se stanoví mimo jiné analytické metody pro retinol (vitamin A); že s ohledem na vědecko-technický pokrok nejsou popsané metody již vhodné pro zamýšlený účel, a proto je třeba je zrušit;

(1) vzhledem k tomu, že podle směrnice 70/373/EHS se úřední kontroly krmiv za účelem zjištění, zda jsou splněny požadavky právních a správních předpisů na jakost a složení krmiv, provádějí metodami odběru vzorků a analytickými metodami Společenství;

(6) vzhledem k tomu, že pátou směrnicí Komise 74/203/EHS ze dne 25. března 1974, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽⁸⁾, naposledy pozměněnou směrnicí 81/680/EHS⁽⁹⁾, se stanoví analytické metody pro škrob a produkty jeho odbourávání vysoké molekulové hmotnosti v krmivech obsahujících řízky a vyloužené řízky z řep, sušené řepné listy a řepný chrást, bramborový rmut, sušené kvasnice, výrobky obsahující inulin nebo škvarky, amprolium, ethopabát, dinitolmid, nicarbazin a menadion (vitami K3); že s ohledem na vědecko-technický pokrok všechny popsané metody již nejsou vhodné pro zamýšlený účel, a proto je třeba je zrušit;

(2) vzhledem k tomu, že podle směrnice Rady 70/524/EHS ze dne 23. listopadu 1970 o doplňkových látkách v krmivech⁽²⁾, naposledy pozměněné nařízením Komise (ES) č. 45/1999⁽³⁾, musí být při etiketování uváděn obsah amprolia a diclazurilu, pokud tyto látky byly přidány do premixů nebo krmiv; že povolení carbadoxu jako doplňkové látky ve výživě zvířat bylo zrušeno nařízením Komise (ES) č. 2788/98 ze dne 22. prosince 1998, kterým se mění směrnice Rady 70/524/EHS o doplňkových látkách v krmivech s ohledem na zrušení povolení určitých růstových stimulantů⁽⁴⁾, a že je nutná úřední kontrola možného protiprávního použití zakázaných látek;

(7) vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

(3) vzhledem k tomu, že je třeba stanovit analytické metody Společenství pro kontrolu těchto látek;

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

(4) vzhledem k tomu, že první směrnicí Komise 71/250/EHS ze dne 15. června 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽⁵⁾, naposledy pozměněnou směrnicí 98/54/ES⁽⁶⁾, se stanoví mimo jiné analytické metody pro hořčičnou

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu obsahu amprolia, diclazurilu a carbadoxu v krmivech se provádějí metodami popsanými v příloze.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. L 270, 14.12.1970, s. 1.

⁽³⁾ Úř. věst. L 6, 12.1.1999, s. 3.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 347, 23.12.1998, s. 31.

⁽⁵⁾ Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.

⁽⁶⁾ Úř. věst. L 208, 24.7.1998, s. 49.

⁽⁷⁾ Úř. věst. L 83, 30.8.1973, s. 21.

⁽⁸⁾ Úř. věst. L 108, 22.4.1974, s. 7.

⁽⁹⁾ Úř. věst. L 246, 29.8.1981, s. 32.

Článek 2

Směrnice 71/250/EHS se mění takto:

1. V článku 1 se zrušují slova „hořčičné silice“ a „theobrominu“.
2. Body 8 a 13 přílohy se zrušují.

Článek 3

Směrnice 73/46/EHS se mění takto:

1. Článek 2 se zrušuje.
2. Příloha II se zrušuje.

Článek 4

Pátá směrnice 74/203/EHS se zrušuje.

Článek 5

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. října 1999. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Budou tyto předpisy používat od 1. listopadu 1999.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 6

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Článek 7

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 20. dubna 1999.

Za Komisi

Franz FISCHLER

člen Komise

PŘÍLOHA

ČÁST A

STANOVENÍ AMPROLIA

1-[(4-amino-2-propyl-pyrimidinyl)-metyl]-2-picoliniumchlorid hydrochlorid

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda slouží ke stanovení amprolia v krmivech a premixech. Mez prokazatelnosti činí 1 mg/kg, mez stanovitelnosti 25 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje směsí metanolu a vody. Po zředění mobilní fáze a membránové filtraci se obsah amprolia stanoví vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na katexovém materiálu s použitím ultrafialového detektoru.

3. **Činidla**

3.1 Metanol

3.2 Acetonitril čistoty pro HPLC

3.3 Voda čistoty pro HPLC

3.4 Roztok dihydrofosforečnanu sodného, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

13,80 g dihydrofosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (3.3) v odměrné baňce objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.3) po rysku a promíchá se.

3.5 Roztok chloristanu sodného, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

224,74 g chloristanu sodného se rozpustí ve vodě (3.3) v odměrné baňce objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.3) po rysku a promíchá se.

3.6 Mobilní fáze pro HPLC (viz poznámka 9.1)

Směs acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrofosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (V + V + V)}$. Roztok se před použitím přefiltruje přes membránový filtr (4.3) a zbaví plynů (např. v ultrazvukové lázni (4.4) po dobu 15 minut).

3.7 Standardní substance: amprolium, čisté, 1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)-metyl]-2-picoliniumchlorid hydrochlorid, E 750 (viz 9.2)

3.7.1 Základní standardní roztok amprolia, 500 µg/ml

Do odměrné baňky objemu 100 ml se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg amprolia (3.7), rozpustí se v 80 ml metanolu (3.1) a postaví se na 10 minut do ultrazvukové lázně (4.4). Po působení ultrazvuku se roztok zchladí na pokojovou teplotu, doplní se vodou po rysku a promíchá se. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.7.2 Pracovní standardní roztok amprolia, 50 µg/ml

5,0 ml základního standardního roztoku (3.7.1) se napipetuje do odměrné baňky objemu 50 ml, doplní po rysku extrakční směsí (3.8) a promíchá se. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.7.3 Kalibrační roztoky

Do odměrných baněk objemu 50 ml se napipetuje 0,5, 1,0 a 2,0 ml pracovního standardního roztoku (3.7.2), doplní se po rysku mobilní fází (3.6) a promíchá se. Tyto roztoky obsahují 0,5, 1,0 a 2,0 µg amprolia v 1 ml. Roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.

3.8 Extrakční směs

Směs metanolu (3.1) a vody 2 + 1 (V + V)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Zařízení pro HPLC se vstřikovacím systémem pro injektované objemy 100 µl

4.1.1 Separační kolona pro katexovou chromatografii, zrnění 10 µm, 125 mm x 4 mm, např. Nucleosil 10 SA, 10 µm, nebo podobná

4.1.2 Ultrafialový detektor s měnitelným nastavením vlnové délky nebo diodový array detektor

4.2 Membránový filtr, materiál PTFE, velikost pórů 0,4 µm

4.3 Membránový filtr, velikost pórů 0,22 µm

4.4 Ultrazvuková lázeň

4.5 Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka

5. Postup

5.1 Obecně

5.1.1 Slepý pokus

Pro provedení zkoušek na výtěžnost (5.1.2) by se měl provést slepý pokus za účelem kontroly, že nejsou přítomny ani amprolium ani rušící látky. Slepý vzorek by měl mít podobné složení jako zkoumaný vzorek a amprolium nebo rušící látky by neměly být prokazatelné.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Procentní výtěžek se zjišťuje analýzou slepého vzorku, ke kterému bylo přidáno množství amprolia odpovídající množství amprolia ve vzorku. Pro obohacení na obsah 100 mg/kg se 10,0 ml základního standardního roztoku (3.7.1) převede do Erlenmayerovy baňky objemu 250 ml a roztok se odpaří na přibližně 0,5 ml. Poté se přidá 50 g slepého vzorku. Důkladně se promíchá, nechá se 10 minut stát a znovu se několikrát promíchá, než se začne s extrakcí (5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek podobný zkoumanému vzorku (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost adiční metodou. V tom případě se zkoumaný vzorek obohatí množstvím amprolia odpovídajícím množstvím amprolia ve vzorku. Tento vzorek se zkoumá společně se vzorkem neobohaceným a procentní výtěžek lze zjistit odečtením.

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva a premixy (obsah amprolia < 1 %)

Podle obsahu amprolia se do Erlenmayerovy baňky objemu 500 ml s přesností na 0,01 g naváží 5 až 40 g vzorku a přidá se 200 ml extrakční směsi (3.8). Na baňku se 15 minut působí v ultrazvukové lázni (4.4), poté se 1 hodinu protřepává na třepačce nebo míchá magnetickou míchačkou (4.5). Alikvóta extraktu se zředí mobilní fází (3.6) na obsah amprolia mezi 0,5 a 2 µg/ml a pomíchá se (viz poznámka 9.3). 5 až 10 ml tohoto naředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (4.2) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.3).

5.2.2 Premixy (obsah amprolia 1 %)

Podle obsahu amprolia se do Erlenmayerovy baňky objemu 500 ml s přesností na 0,001 g naváží 1 až 4 g premixu a přidá se 200 ml extrakční směsi (3.8). Na baňku se 15 minut působí v ultrazvukové lázni (4.4) poté se 1 hodinu protřepává na třepačce nebo míchá magnetickou míchačkou (4.5). Alikvóta extraktu se zředí mobilní fází (3.6) na obsah amprolia mezi 0,5 a 2 µg/ml a pomíchá se. 5 až 10 ml tohoto naředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (4.2) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry

Níže uvedené hodnoty jsou směrné hodnoty; lze použít jiné parametry, pokud vedou ke srovnatelným výsledkům.

Separční kolona pro katexovou 125 mm x 4 mm, např. Nucleosil 10 SA, 10 µm nebo podobná chromatografii (4.1.1):

Mobilní fáze (3.6): Směs acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrofosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V)

Průtoková rychlost: 0,7 až 1 ml/min

Vlnová délka detekce: 264 nm

Injektovaný objem: 100 µl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje několikanásobným nástřikem kalibračního roztoku (3.7.3) obsahujícího 1,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (ploch) píku a retenčních časů.

5.3.2 Sestrojení kalibrační křivky

Každý kalibrační roztok (3.7.3) se nástřikuje několikrát a měří se střední výšky (plochy) píků při jednotlivých koncentracích. Kalibrační křivka se sestrojí tak, že se na pořadnici vynesou střední výšky (plochy) píků kalibračních roztoků a na abscise jim odpovídající koncentrace v µg/ml.

5.3.3 Stanovení roztoku vzorku

Extrakt ze vzorku (5.2) se nástřikuje několikrát, přičemž se používá totéž množství jako pro nástřik kalibračních roztoků. Zjišťuje se střední výška (plocha) píku amprolia.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Ze střední výšky (plochy) píku amprolia u roztoku vzorku se podle kalibrační křivky (5.3.2) stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml.

Obsah amprolia w v mg/kg ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{V \cdot \vartheta \cdot f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kde

V = objem extrakční směsi se vzorkem v ml podle 5.2 (tj. 200 ml)

ϑ = koncentrace amprolia v roztoku vzorku (5.2) v µg/ml

f = faktor ředění podle 5.2

m = navážka vzorku v g

7. Kontrola výsledků

7.1 Identita

Identitu analytů lze potvrdit kochromatografií nebo pomocí diodového array detektoru, přičemž se srovnávají spektra roztoku vzorku (5.2) a kalibračního roztoku (3.7.3) obsahujícího 2,0 µg/ml.

7.1.1 Kochromatografie

K roztoku vzorku (5.2) se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.7.3). Přidané množství amprolia by mělo odpovídat obsahu amprolia v extraktu vzorku.

Při zohlednění přidaného množství a ředění extraktu smí být zvětšená jen výška píku amprolia. Šířka píku v poloviční výšce by se neměla od šířky původního píku amprolia v neobohaceném extraktu vzorku odchýlovat o více než $\pm 10\%$.

7.1.2 Diodová array detekce

Výsledky se hodnotí podle následujících kritérií:

- Vlnová délka při maximální absorpci vzorku a standardního spektra na vrcholu píku chromatogramu musí souhlasit v oblasti, která je určena rozlišovací schopností detekčního systému. Pro diodovou array detekci tato oblast obvykle činí ± 2 nm.
- Mezi 210 a 320 nm se spektrum vzorku a standardní spektrum na vrcholech píků chromatogramu nesmějí v oblasti mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě sledování vyšší než 15 % absorpce standardních analytů.
- Mezi 210 a 320 nm se spektra extraktu vzorku na čele, vrcholu a týlu píku vzorku nesmějí v oblasti spektra mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě sledování vyšší než 15 % absorpce spektra na vrcholu píku.

Není-li toto kritérium splněno, považuje se přítomnost analytu za nepotvrzenou.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou souběžných stanovení u téhož vzorku nesmí

- u obsahu amprolia mezi 25 mg/kg a 500 mg/kg překročit 15 % vyššího výsledku,
- u obsahu amprolia mezi 500 mg/kg a 1 000 mg/kg překročit 75 mg/kg,
- u obsahu amprolia vyššího než 1 000 mg/kg překročit 7,5 % vyššího výsledku.

7.3 Procentní výtěžek

U obohaceného (slepého) vzorku by procentní výtěžek měl činit nejméně 90 %.

8. Výsledky hromadné analýzy

Při hromadné analýze byla zkoumána tři drůbeží krmiva (vzorky 1 až 3), minerální krmivo (vzorek 4) a premix (vzorek 5). Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce.

	Vzorek 1 (slepý vzorek)	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
L	14	14	14	14	15
A	56	56	56	56	60
Průměrná hodnota [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
žádaný obsah [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: počet laboratoří
n: počet jednotlivých hodnot
 s_r : standardní odchylka opakovatelnosti
 CV_r : variační koeficient opakovatelnosti
 s_R : standardní odchylka srovnatelnosti
 CV_R : variační koeficient srovnatelnosti

9. Poznámky

- 9.1 Obsahuje-li vzorek tiamin, objeví se pík tiaminu v chromatografii krátce před píkem ambrolia. Při použití této metody by se amprolium a tiamin měly oddělit. Nejsou-li amprolium a tiamin separovány kolonou (4.1.1) použitou v této metodě, by se mělo až 50 % acetonitrilového podílu mobilní fáze (3.6) nahradit metanolem.
- 9.2 Podle britského lékopisu vykazuje spektrum roztoku ambrolia ($c = 0,2 \text{ mol/l}$) v kyselině chlorovodíkové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) maxima při 246 nm a 262 nm. Absorpce by měla činit při 246 nm 0,84 a při 262 nm 0,80.
- 9.3 Extrakt by se vždy měl ředit mobilní fází, jelikož jinak se retenční čas píku ambrolia značně posouvá změnami iontové síly.

ČÁST B**STANOVENÍ DICLAZURILU**

2,6-dichlor-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)yl)benzenacetonitril

1. Účel a oblast použití

Tato metoda slouží ke stanovení diclazurilu v krmivech a premixech. Mez prokazatelnosti činí 0,1 mg/kg, mez stanovitelnosti 0,5 mg/kg.

2. Princip

Po přidání interního standardu se vzorek extrahuje metanolem okyseleným kyselinou chlorovodíkovou. U krmiv se alikvóta extraktu čistí extrakční patronou s tuhou fází C 18. Diclazuril ze z patrony eluuje směsí metanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou a vody. Po odpaření se zbytek rozpustí v DMF/vodě. U premixů se extrakt odpaří a zbytek se rozpustí v DMF/vodě. Obsah diclazurilu se stanoví (čtyřsložkovou) gradientovou vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s obrácenou fází a s použitím ultrafialového detektoru.

3. Činidla

- 3.1 Voda čistoty pro HPLC
- 3.2 Octan amonný
- 3.3 Tetrabutylamoniumhydrosíran (TBHS)
- 3.4 Acetonitril čistoty pro HPLC
- 3.5 Metanol čistoty pro HPLC
- 3.6 N,N-dimetylformamid (DMF)
- 3.7 Kyselina chlorovodíková $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8 Standardní substance: diclazuril II-24: 2,6-dichlor-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)yl)benzenacetonitril, zaručeně čistý, E 771
- 3.8.1 Základní standardní roztok diclazurilu, 500 $\mu\text{g/ml}$

Do odměrné baňky objemu 50 ml se s přesností na 0,1 mg naváží 25 mg diclazurilu (3.8), rozpustí se v DMF (3.6), doplní se DMF (3.6) po rysku a promíchá se. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.8.2 Standardní roztok diclazurilu, 50 µg/ml

Do odměrné baňky objemu 50 ml se převede 5,00 ml základního standardního roztoku (3.8.1), doplní se DMF (3.6) po rysku a promíchá se. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9 Interní standardní substance: 2,6-dichloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)-yl)- α -methylbenzén-acetonitril

3.9.1 Interní základní standardní roztok, 500 µg/ml

Do odměrné baňky objemu 50 ml se s přesností na 0,1 mg naváží 25 mg interní standardní substance (3.9), rozpustí se v DMF (3.6), doplní se DMF (3.6) po rysku a promíchá se. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.2 Interní standardní roztok, 50 µg/ml

Do odměrné baňky objemu 50 ml se převede 5,00 ml interního standardního roztoku (3.9.1), doplní se DMF (3.6) po rysku a promíchá se. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.3 Interní standardní roztok pro premixy, p/1 000 mg/ml (p = žádaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg)

Do odměrné baňky objemu 100 ml se s přesností na 0,1 mg naváží p/10 mg interní standardní substance, rozpustí se v DMF (3.6) v ultrazvukové lázni (4.6), doplní DMF (3.6) po rysku a promíchá se. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden měsíc.

3.10 Kalibrační roztok, 2 µg/ml

Do odměrné baňky objemu 50 ml se napipetuje 2,00 ml standardního roztoku diclazurilu (3.8.2) a 2,00 ml interního standardního roztoku (3.9.2). Přidá se 16 ml DMF (3.6), doplní se vodou po rysku a promíchá se. Tento roztok se připravuje čerstvý před použitím.

3.11 Extrakční patrona s tuhou fází C 18, sorpční množství 100 mg, např. Bond Elut

3.12 Extrakční směs: metanol okyselený kyselinou chlorovodíkovou

Do 1 000 ml metanolu (3.5) se napipetuje 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.7) a promíchá se.

3.13 Mobilní fáze pro HPLC

Eluční rozpouštědlo A: roztok octanu amonného a tetrabutylamoniumhydrosíranu

3.13.1 5 g octanu amonného (3.2) a 3,4 g TBHS (3.3) se rozpustí v 1 000 ml vody a promíchá se.

3.13.2 Eluční rozpouštědlo B: acetonitril (3.4)

3.13.3 Eluční rozpouštědlo C: metanol (3.5)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mechanická třepačka

4.2 Zařízení pro HPLC pro čtyřsložkový gradient

4.2.1 Separační kolona pro chromatografii s obrácenou fází, zrnění 3 µm, 100 mm x 4,6 mm, např. Hypersil ODS nebo podobný materiál

4.2.2 Ultrafialový detektor s měnitelným nastavením vlnové délky nebo diodový array detektor

4.3 Vakuová rotační odparka

4.4 Membránový filtr, velikost pórů 0,45 µm

- 4.5 Vakuové zařízení
- 4.6 Ultrazvuková lázeň

5. Postup

5.1 Obecně

5.1.1 Slepý pokus

Měl by se provést slepý pokus za účelem kontroly, že nejsou přítomny ani diclazuril ani rušící látky. Slepý vzorek by měl mít podobné složení jako zkoumaný vzorek a diclazuril nebo rušící látky by neměly být prokazatelné.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Procentní výtěžek se zjišťuje analýzou slepého vzorku, ke kterému bylo přidáno množství diclazurilu odpovídající množství diclazurilu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 1 mg/kg se k 50 g slepého vzorku přidá 0,1 ml základního standardního roztoku (3.8.1). Důkladně se promíchá, nechá se 10 minut stát a znovu se několikrát promíchá, než se začne s extrakcí (5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek podobný zkoumanému vzorku (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost adiční metodou. V tom případě se zkoumaný vzorek obohatí množstvím diclazurilu odpovídajícím množstvím ve vzorku již obsaženému. Tento vzorek se zkoumá společně se vzorkem neobohaceným a procentní výtěžek lze zjistit odečtením.

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva

Do Erlenmayerovy baňky objemu 500 ml se s přesností na 0,01 g naváží 50 g vzorku. Přidá se 1,00 ml interního standardního roztoku (3.9.2) a 200 ml extrakční směsi (3.12) a baňka se uzavře. Směs se přes noc protřepává na třepačce (4.1) a poté se nechá 10 minut stát. Alikvóta 20 ml supernatantu se převede do vhodné skleněné nádoby a zředí se 20 ml vody. Tento roztok se dá na extrakční patronu (3.11) a prosaje se pomocí vakua (4.5). Patrona se vymyje 25 ml směsi z extrakční směsi (3.12) a vody, 65 + 35 (V + V). Sbírané frakce se nepoužijí, účinná látka a interní standard se eluují 25 ml směsi z extrakční směsi (3.12) a vody, 80 + 20 (V + V). Tato frakce se v rotační odparce (4.3) zahustí při 60 °C a za sníženého tlaku dosucha. Zbytek se rozpustí v 1,0 ml DMF (3.6), přidá se 1,5 ml vody (3.1) a promíchá se. Roztok se přefiltruje přes membránový filtr (4.4) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.3).

5.2.2 Premixy

Do Erlenmayerovy baňky objemu 500 ml se s přesností na 0,001 g naváží 1 g vzorku. Přidá se 1,00 ml interního standardního roztoku (3.9.3) a 200 ml extrakční směsi (3.12) a baňka se uzavře. Směs se přes noc protřepává na třepačce (4.1) a poté se nechá 10 minut stát. Alikvóta 10 000/p ml (p = žádaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg) supernatantu se převede do kulaté baňky vhodné velikosti. V rotační odparce (4.3) se zahustí za sníženého tlaku při 60 °C dosucha. Zbytek se rozpustí v 10,0 ml DMF (3.6), přidá se 15,0 ml vody (3.1) a promíchá se. Poté se provede stanovení pomocí HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry

Níže uvedené hodnoty jsou směrné hodnoty, lze použít jiné parametry, pokud vedou ke srovnatelným výsledkům:

- Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.2.1): 100 mm x 4,6 mm, náplň Hypersil ODS, 3 µm, nebo podobný materiál
- Mobilní fáze:

Eluční rozpouštědlo A (3.13.1):	vodný roztok octanu amonného a tetrabutylamoniumhydrosíranu
Eluční rozpouštědlo B (3.13.2):	acetonitril
Eluční rozpouštědlo C (3.13.3):	metanol

- Druh eluce:
 - lineární gradientová eluce
 - výchozí podmínky: $A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)$
 - po 10 minutách gradientové eluce 30 minut do: $A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)$
 - 10 minut vyplachovat B
- Průtoková rychlost: 1,5 až 2 ml/min
- Injektovaný objem: 20 µl
- Vlnová délka detekce: 280 nm

Stabilita chromatografického systému se kontroluje několikanásobným nástřikem kalibračního roztoku (3.10) obsahujícího 2 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (ploch) píku a retenčních časů.

5.3.2 Stanovení kalibračního roztoku

Několikrát se nástřikuje 20 µl kalibračního roztoku (3.10) a stanoví se střední výška (plocha) píku diclazurilu a interního standardu.

5.3.3 Stanovení roztoku vzorku

Několikrát se nástřikuje 20 µl roztoku vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) a stanoví se střední výška (plocha) píku diclazurilu a interního standardu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1. Krmiva

Obsah diclazurilu w (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \vartheta_{d,c} \cdot 10 \cdot V}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

kde

$h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v roztoku vzorku (5.2.1)

$h_{i,s}$ = výška (plocha) píku interního standardu v roztoku vzorku (5.2.1)

$h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v kalibračním roztoku (3.10)

$h_{i,c}$ = výška (plocha) píku interního standardu v kalibračním roztoku (3.10)

$\vartheta_{d,c}$ = koncentrace diclazurilu v kalibračním roztoku v µg/ml (3.10)

m = navážka vzorku v g

V = objem extrakční směsi podle 5.2.1 (tj. 2,5 ml)

6.2 Premixy

Obsah diclazurilu w (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \vartheta_{d,c} \cdot 0,02 \cdot V \cdot p}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

kde

$h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v roztoku vzorku (5.2.2)

$h_{i,c}$ = výška (plocha) píku interního standardu v roztoku vzorku (5.2.2)

$h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v kalibračním roztoku (3.10)

$h_{i,s}$ = výška (plocha) píku interního standardu v kalibračním roztoku (3.10)

$\vartheta_{d,c}$ = koncentrace diclazurilu v kalibračním roztoku (3.10)

m = navážka vzorku v g

V = objem extrakční směsi podle 5.2.1 (tj. 2,5 ml)

p = žádaný obsah diclazurilu v mg/kg v premixu

7. Kontrola výsledků

7.1 Identita

Identitu analytů lze potvrdit kochromatografií nebo s použitím diodového array detektoru, přičemž se srovnávají spektra extraktu vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) a kalibračního roztoku (3.10).

7.1.1 Kochromatografie

K extraktu vzorku upravenému podle 5.2.1 nebo 5.2.2 se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.10). Přidané množství diclazurilu by mělo odpovídat obsahu diclazurilu v extraktu vzorku.

Při zohlednění přidaného množství a ředění extraktu smí být zvětšená jen výška píku diclazurilu a výška píku interního standardu. Šířka píku v poloviční výšce by se neměla od šířky původního píku diclazurilu nebo píku standardu neobohaceného extraktu vzorku odchylovat o více než $\pm 10\%$.

7.1.2 Diodová array detekce

Výsledky se hodnotí podle následujících kritérií:

- Vlnová délka při maximální absorpci vzorku a standardního spektra na vrcholu píku chromatogramu musí souhlasit v oblasti, která je určena rozlišovací schopností detekčního systému. Pro diodovou array detekci tato oblast obvykle činí ± 2 nm.
- Mezi 230 a 320 nm se spektrum vzorku a standardní spektrum na vrcholech píků chromatogramu nesmějí v oblasti mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě vyšší než 15 % absorpce standardního analytu.
- Mezi 230 a 320 nm se spektra extraktu vzorku na čele, vrcholu a týlu píku vzorku nesmějí v oblasti spektra mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě sledování vyšší než 15 % absorpce spektra na vrcholu píku.

Není-li toto kritérium splněno, považuje se přítomnost analytu za nepotvrzenou.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou souběžných stanovení u téhož vzorku nesmí překročit následující hodnoty:

- 30 % vyššího výsledku u obsahu diclazurilu mezi 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg u obsahu diclazurilu mezi 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,
- 15 % vyššího výsledku u obsahu diclazurilu nad 5 mg/kg.

7.3 Procentní výtěžek

U obohaceného (slepého) vzorku by procentní výtěžek měl činit nejméně 80 %.

8. Výsledky hromadné analýzy

Při hromadné analýze bylo 5 vzorků zkoumáno 11 laboratořemi. Tyto vzorky sestávaly ze dvou směsí premixů, z nichž jedna byla smísená s organickou (O 100) a druhá s anorganickou maticí (A 100). Teoretický obsah diclazurilu je 100 mg/kg. Tři hotová drůbeží krmiva pocházela od 3 různých výrobců (NL) (L1/Z1/K1). Teoretický obsah diclazurilu je 1 mg/kg. Laboratoře byly pověřeny, aby každý ze vzorků zkoumaly jednou nebo dvakrát. (Přesnější údaje o této hromadné analýze viz *Journal of AOAC International*, Volume 77, 1994, s. 1359-1361.). Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce:

	Vzorek 1 A 100	Vzorek 2 O 100	Vzorek 3 L 1	Vzorek 4 Z 1	Vzorek 5 K 1
L	11	11	11	11	16
A	19	18	19	19	12
průměrná hodnota	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
s _r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r [%]	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
s _R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R [%]	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
žádaný obsah [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: počet laboratoří
n: počet jednotlivých hodnot
s_r: standardní odchylka opakovatelnosti
CV_r: variační koeficient opakovatelnosti
s_R: standardní odchylka srovnatelnosti
CV_R: variační koeficient srovnatelnosti

9. Poznámky

Musí být předem prokázáno, že signál diclazurilu je v lineární oblasti koncentrace.

ČÁST C

STANOVENÍ CARBADOXU

Metyl-3-(2-chinoxalinylnmetylén)-carbazat-N¹, N⁴-dioxid

1. Účel a oblast použití

Tato metoda slouží ke stanovení carbadoxu v krmivech, premixech a přípravcích. Mez prokazatelnosti činí 1 mg/kg, mez stanovitelnosti 10 mg/kg.

2. Princip

Vzorek se předupraví vodou a poté se extrahuje směsí metanolu a acetonitrilu. U krmiv se alikvóta přefiltrovaného extraktu vyčistí v koloně s oxidem hlinitým. U premixů a přípravků se alikvóta přefiltrovaného extraktu přímo zředí směsí vody, metanolu a acetonitrilu na vhodnou koncentraci. Obsah carbadoxu se stanoví vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s obrácenou fází s použitím ultrafialového detektoru.

3. Činidla

3.1 Metanol

3.2 Acetonitril čistoty pro HPLC

3.3 Kyselina octová, w = 100 %

3.4 Oxid hlinitý: neutrální, stupeň aktivity I

3.5 Směs metanolu a acetonitrilu 1 + 1 (V + V)

500 ml metanolu (3.1) se smísí s 500 ml acetonitrilu (3.2).

3.6 Kyselina octová, σ = 10 %

10 ml kyseliny octové (3.3) se smísí se 100 ml vody.

3.7 Octan sodný, CH₃COONa

- 3.8 Voda čistoty pro HPLC
- 3.9 Octanový ústojný roztok, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
0,82 g octanu sodného (3.7) se rozpustí v 700 ml vody (3.8) a kyselinou octovou (3.6) se upraví pH na 6,0. Roztok se převede do odměrné baňky objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.8) po rysku a promíchá se.
- 3.10 Mobilní fáze pro HPLC
825 ml octanového ústojného roztoku (3.9) se smísí se 175 ml acetonitrilu (3.2). Roztok se přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů $0,22 \mu\text{m}$ (4.5) a zbaví se plynů (např. v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut).
- 3.11 Standardní substance:
Carbadox, čistý, metyl-3-(2-chinoxalinylmethyl)-carbazat- N^1 , N^4 -dioxid, E 850
- 3.11.1 Základní standardní roztok carbadoxu, $100 \mu\text{g/ml}$ (viz bod 5. Postup)
Do odměrné baňky objemu 250 ml se s přesností na 0,1 mg naváží 25 mg carbadoxu (3.11) a v ultrazvukové lázni (4.7) se rozpustí ve směsi metanolu a acetonitrilu. Po působení ultrazvuku se roztok zchladí na pokojovou teplotu, doplní se směsí metanolu a acetonitrilu (3.5) po rysku a promíchá se. Baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z hnědého skla) a uchovává se v chladnici. Roztok je při teplotě 4°C stálý jeden měsíc.
- 3.11.2 Kalibrační roztoky
Do odměrných baněk objemu 100 ml se převede 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml základního standardního roztoku (3.11.1). Přidá se po 30 ml vody, doplní se po rysku směsí metanolu a acetonitrilu a promíchá se. Baňka se obalí hliníkovou fólií. Tyto roztoky obsahují 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 μg carbadoxu v 1 ml. Kalibrační roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.
Poznámka:
Pro stanovení carbadoxu v krmivech obsahujících méně než 10 mg/kg se musí připravovat kalibrační roztoky koncentrace nižší než $2,0 \mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Směs vody a směsi metanolu a acetonitrilu (3.5), $300 + 700 (V + V)$
300 ml vody se smísí se 700 ml směsí metanolu a acetonitrilu (3.5).
4. **Přístroje a pomůcky**
- 4.1 Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka
- 4.2 Filtrační papír sklovláknitý, např. Whatman GF/A nebo podobný
- 4.3. Skleněná kolona (délka 300 až 400 mm, světlost přibližně 10 mm) s fritou a vypouštěcím kohoutem
Poznámka:
Lze použít i skleněnou kolonu s kohoutem a kónicky zúženou skleněnou kolonu; v tom případě se do spodní části kolony vloží malá zátka ze skleněné vaty.
- 4.4 Zařízení pro HPLC se vstříkovacím systémem pro injektované objemy $20 \mu\text{l}$
- 4.4.1 Separační kolona pro chromatografii s obrácenou fází, zrnění $10 \mu\text{m}$, $300 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, plněná materiálem C18
- 4.4.2 Ultrafialový detektor s měnitelným nastavením vlnové délky nebo diodový array detektor s měřicím rozsahem od 225 do 400 nm
- 4.5 Membránový filtr, velikost pórů $0,22 \mu\text{m}$
- 4.6 Membránový filtr, velikost pórů $0,45 \mu\text{m}$
- 4.7 Ultrazvuková lázeň
5. **Postup**
Poznámka:
Carbadox je světlocitlivý. Všechny kroky je proto třeba provádět při tlumeném světle nebo je třeba použít hnědého skla resp. sklo obalit hliníkovou fólií.
- 5.1 *Obecně*

5.1.1 Slepý pokus

Pro provedení zkoušek na výtěžnost (5.1.2) by se měl provést slepý pokus za účelem kontroly, že nejsou přítomny ani carbadox ani rušící látky. Slepý vzorek by měl mít podobné složení jako zkoumaný vzorek a carbadox nebo rušící látky by neměly být prokazatelné.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Procentní výtěžek se zjišťuje analýzou slepého vzorku (5.1.1), ke kterému bylo přidáno množství carbadoxu odpovídající množství carbadoxu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 50 mg/kg se 5,0 ml základního standardního roztoku (3.1.1.1) převede do Erlenmayerovy baňky objemu 200 ml. Roztok se v proudu dusíku odpaří na přibližně 0,5 ml. Přidá se 10 g slepého vzorku, promíchá se a nechá se 10 minut stát, než se začne s extrakcí (5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek podobný zkoumanému vzorku (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost adiční metodou. V tom případě se zkoumaný vzorek obohatí množstvím carbadoxu odpovídajícím množství carbadoxu ve vzorku již obsaženému. Tento vzorek se zkoumá společně se vzorkem neobohaceným a procentní výtěžek lze zjistit odečtením.

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva

Do Erlenmayerovy baňky objemu 200 ml se s přesností na 0,01 g naváží 10 g vzorku. Přidá se 15,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 35,0 ml směsi metanolu a acetonitrilu (3.5), baňka se uzavře a poté se 30 minut protřepává na třepačce nebo míchá magnetickou míchačkou (4.1). Roztok se přefiltruje přes sklovláknitý papírový filtr (4.2) a takto je připravený k čištění (5.3).

5.2.2 Premixy (0,1 až 2,0 %)

Do Erlenmayerovy baňky objemu 200 ml se s přesností na 0,001 g naváží 1 g nemletého premixu. Přidá se 15,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 35,0 ml směsi metanolu a acetonitrilu (3.5), baňka se uzavře a 30 minut se protřepává na třepačce nebo míchá magnetickou míchačkou (4.1). Roztok se přefiltruje přes sklovláknitý papírový filtr (4.2). Alikvóta filtrátu se dá do odměrné baňky objemu 50 ml. Přidá se 15,0 ml vody, doplní se směsí metanolu a acetonitrilu (3.5) po rysku a promíchá se. Koncentrace carbadoxu v hotovém roztoku by měla činit přibližně 10 µg/ml. Alikvóta se přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm (4.6) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.4).

5.2.3 Přípravky (> 2 %)

Do Erlenmayerovy baňky objemu 250 ml se s přesností na 0,001 g naváží 0,2 g nemletého vzorku. Přidá se 45,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 105,0 ml směsi metanolu a acetonitrilu (3.5). Uzavřená baňka se na 15 minut dá do ultrazvukové lázně (4.7) a poté se 15 minut protřepává na třepačce nebo míchá magnetickou míchačkou (4.1). Roztok se přefiltruje přes sklovláknitý papírový filtr (4.2). Alikvóta filtrátu se zředí směsí metanolu a acetonitrilu (3.12), aby se získala koncentrace carbadoxu mezi 10 a 15 µg/ml (pro 10 % přípravek činí faktor ředění 10). Alikvóta se přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm (4.6) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.4).

5.3 Čištění

5.3.1 Příprava kolony s oxidem hlinitým

Do skleněné kolony (4.3) se vpraví 4 g oxidu hlinitého (3.4).

5.3.2 Čištění vzorku

Do kolony s oxidem hlinitým se vpraví 15 ml přefiltrovaného extraktu (5.2.1) a první 2 ml eluátu se nepoužije. Následujících 5 ml se zachycuje, alikvóta z nich se přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm (4.6) a poté se použije ke stanovení pomocí HPLC (5.4).

5.4 Stanovení HPLC

5.4.1 Parametry

Níže uvedené hodnoty jsou směrné hodnoty, lze použít jiné parametry, pokud vedou ke srovnatelným výsledkům:

Separáční kolona pro chromatografii s obrácenou fází (4.1.1): 300 mm x 4 mm, náplň C18, 10 µm

Mobilní fáze (3.10): Směs octanového ústojného roztoku (3.9) a acetonitrilu (3.2), 825 + 175 (V + V)

Průtoková rychlost: 1,5 až 2 ml/min

Injektovaný objem: 20 µl

Vlnová délka detekce: 365 nm

Stabilita chromatografického systému se kontroluje několikanásobným nástřikem kalibračního roztoku (3.11.2) obsahujícího 5,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (ploch) píku a retenčních časů.

5.4.2 Kalibrační křivka

Každý kalibrační roztok (3.11.2) se nástřikuje několikrát a měří se výšky (plochy) píků při jednotlivých koncentracích. Kalibrační křivka se sestrojí tak, že se na pořadnici vynesou střední výšky (plochy) píků a na abscise jim odpovídající koncentrace v µg/ml.

5.4.3 Roztok vzorku

Extrakt ze vzorku [(5.3.2) pro krmiva, (5.2.2) pro premixy a (5.2.3) pro přípravky] se nástřikuje několikrát a zjišťuje se střední výška (plocha) píku carbadoxu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Ze střední výšky (plochy) píku carbadoxu u roztoku vzorku se podle kalibrační křivky (5.4.2) stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml.

6.1 Krmiva

Obsah carbadoxu w (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{\vartheta \cdot V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

kde

ϑ = koncentrace carbadoxu v extraktu vzorku (5.3.2) v µg/ml

V_1 = objem extrakční směsi (tj. 50 ml)

m = navážka vzorku v g

6.2 Premixy a přípravky

Obsah carbadoxu w (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$w = \frac{\vartheta \cdot V_1 \cdot f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kde

ϑ = koncentrace carbadoxu v extraktu vzorku (5.2.2 nebo 5.3.2) v µg/ml

V_2 = objem extrakční směsi (tj. 50 ml pro premixy; 150 ml pro přípravky)

f = faktor ředění podle 5.2.2 (premixy) nebo 5.3.2 (přípravky)

m = navážka vzorku v g

7. Kontrola výsledků

7.1 Identita

Identitu analytů lze potvrdit kochromatografií nebo pomocí diodového array detektoru, přičemž se srovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (3.11.2) obsahujícího 10,0 µg/ml.

7.1.1 Kochromatografie

K extraktu vzorku se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.11.2.). Přidané množství carbadoxu by mělo odpovídat obsahu carbadoxu v extraktu vzorku.

Při zohlednění přidaného množství a ředění extraktu smí být zvětšená jen výška píku carbadoxu. Šířka píku v poloviční výšce by se neměla od šířky původního píku carbadoxu v neobohaceném extraktu vzorku odchýlovat o více než $\pm 10\%$.

7.1.2 Diodová array detekce

Výsledky se hodnotí podle následujících kritérií:

- Vlnová délka při maximální absorpci spektra vzorku a standardu na vrcholu píku chromatogramu musí souhlasit v oblasti, která je určena rozlišovací schopností detekčního systému. Pro diodovou array detekci tato oblast obvykle činí ± 2 nm.
- Mezi 225 a 400 nm se spektrum vzorku a standardní spektrum na vrcholech píků chromatogramu nesmějí v oblasti mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě vyšší než 15 % absorpce standardních analytů.
- Mezi 225 a 400 nm se spektra extraktu vzorku na čele, vrcholu a týlu píku vzorku nesmějí v oblasti spektra mezi 10 % a 100 % relativní absorpce lišit. Toto kritérium je splněno, jestliže maxima jsou stejná a odchylka mezi oběma spektry není na žádném místě sledování vyšší než 15 % absorpce spektra na vrcholu píku.

Není-li toto kritérium splněno, považuje se přítomnost analytu za nepotvrzenou.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou souběžných stanovení nesmí u téhož vzorku u obsahu carbadoxu 10 mg/kg překračovat 15 % vyšší hodnoty.

7.3 Procentní výtěžek

U obohaceného (slepého) vzorku by procentní výtěžek měl činit nejméně 90 %.

8. Výsledky hromadné analýzy

Při hromadné analýze bylo 6 krmiv, 4 premixy a 3 přípravky zkoumáno 8 laboratořemi. Každý vzorek byl zkoumán dvakrát (Přesnější údaje o této hromadné analýze viz *Journal of AOAC International*, Volume 71, 1998, s. 484-490.). Výsledky (s výjimkou extrémních hodnot) jsou shrnuty v níže uvedené tabulce:

Tabulka 1: Výsledky hromadné analýzy u krmiv

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
L	8	8	8	8	8	8
A	45	14	15	15	15	15
Průměrná hodnota [mg/kg]	50,0	47,6	48,2	46,9	46,9	49,7
s_r [mg/kg]	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r [%]	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
s_R [mg/kg]	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R [%]	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
žádaný obsah [mg/kg]	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabulka 2: Výsledky hromadné analýzy u premixů a přípravků

	Premixy				Přípravky		
L	7	7	7	7	8	8	8
A	14	14	14	14	16	16	16
Průměrná hodnota [mg/kg]	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
s_r [mg/kg]	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r [%]	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
s_R [mg/kg]	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R [%]	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
žádaný obsah [g/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: počet laboratoří

N: počet jednotlivých hodnot

 S_r : standardní odchylka opakovatelnosti CV_r : variační koeficient opakovatelnosti S_R : standardní odchylka srovnatelnosti CV_R : variační koeficient srovnatelnosti