

KOMMISSIONENS DIREKTIV 1999/27/EF

af 20. april 1999

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til bestemmelse af amprolium, diclazuril og carbadox i foderstoffer og om ændring af direktiv 71/250/EØF og 73/46/EØF og ophævelse af direktiv 74/203/EØF

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det
Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20.
juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagnings-
måder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle
kontrol med foderstoffer⁽¹⁾, senest ændret ved akten om
Østrigs, Finlands og Sveriges tiltrædelse, særlig artikel 2,
og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Direktiv 70/373/EØF fastsætter, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat ved lov eller administrative bestemmelser, for foderstoffers beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foretages efter fælles prøveudtagningsmåder og -analysemetoder;
- (2) desuden foreskriver Rådets direktiv 70/524/EØF af 23. november 1970 om tilsætningsstoffer til foderstoffer⁽²⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 45/1999⁽³⁾, at amprolium- og diclazurilindholdet skal være angivet i mærkningen, hvis disse stoffer tilsættes til forblandinger og foderstoffer; godkendelsen af anvendelse af carbadox som tilsætningsstof til foderstoffer blev inddraget ved Kommissionens forordning (EF) nr. 2788/98 af 22. december 1998 om ændring af Rådets direktiv 70/524/EØF om tilsætningsstoffer til foderstoffer for så vidt angår inddragelse af godkendelsen af visse vækstoffremmende stoffer⁽⁴⁾ og det er nødvendigt, at der foretages officiel kontrol af eventuel ulovlig brug af forbudte stoffer;
- (3) der bør fastlægges EF-analysemetoder til kontrol med disse stoffer;
- (4) i Kommissionens første direktiv 71/250/EØF af 15. juni 1971 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol af foderstoffer⁽⁵⁾, senest ændret ved direktiv 98/54/EF⁽⁶⁾, er der fastsat analysemetoder til bl.a. bestemmelse af

sennepsolie og theobromin; udviklingen i den videnskabelige og tekniske viden bevirker, at de beskrevne metoder ikke længere er egnede til formålet; disse metoder bør derfor udgå;

- (5) i Kommissionens fjerde direktiv 73/46/EØF af 5. december 1972 om fastsættelse af fælles analysemetoder til officiel kontrol af dyrefoder⁽⁷⁾, senest ændret ved direktiv 98/54/EF, er der fastsat analysemetoder til bl.a. bestemmelse af retinol (vitamin A); udviklingen i den videnskabelige og tekniske viden bevirker, at den beskrevne metode ikke længere er egnet til formålet; metoden for retinol bør derfor udgå;
- (6) Kommissionens femte direktiv 74/203/EØF af 25. marts 1974 om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til officiel kontrol af foderstoffer⁽⁸⁾, ændret ved Kommissionens direktiv 81/680/EØF⁽⁹⁾, er der fastsat analysemetoder til bestemmelse af højmolekylære spaltningsprodukter af stivelse i foderstoffer, som indeholder roesnitte, roeffald, tørrede roeblade eller roetoppe, kartoffelaffald, torgær, inulinholdige produkter eller fedtegrever, amprolium, ethopabat, dinitolmid, nicarbazin og menadion (vitamin K3); den videnskabelige og tekniske viden bevirker, at de metoder, der er beskrevet i nævnte direktiv, ikke længere er egnede til formålet; direktivet bør derfor ophæves;
- (7) de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelser fra Den Stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol med foderstoffer og forblandinger, for så vidt angår amprolium-, diclazuril- og carbadoxindholdet, skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget.

⁽¹⁾ EFT L 170 af 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ EFT L 270 af 14.12.1970, s. 1.

⁽³⁾ EFT L 6 af 12.1.1999, s. 3.

⁽⁴⁾ EFT L 347 af 23.12.1998, s. 31.

⁽⁵⁾ EFT L 155 af 12.7.1971, s. 13.

⁽⁶⁾ EFT L 208 af 24.7.1998, s. 49.

⁽⁷⁾ EFT L 83 af 30.3.1973, s. 21.

⁽⁸⁾ EFT L 108 af 22.4.1974, s. 7.

⁽⁹⁾ EFT L 246 af 29.8.1981, s. 32.

Artikel 2

I direktiv 71/250/EØF foretages følgende ændringer:

- 1) I artikel 1 udgår »sennepsolie« og »theobromin«.
- 2) Punkt 8 og 13 i bilaget udgår.

Artikel 3

I direktiv 73/46/EØF foretages følgende ændringer:

- 1) Artikel 2 udgår.
- 2) Bilag II udgår.

Artikel 4

Direktiv 74/203/EØF ophæves.

Artikel 5

Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv senest den 31. oktober 1999. De underretter straks Kommissionen herom.

De anvender foranstaltningerne fra den 1. november 1999.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne:

Artikel 6

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 7

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 20. april 1999.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

BILAG

Del A

BESTEMMELSE AF AMPROLIUM

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picoliniumklorid hydroklorid

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden kan benyttes til bestemmelse af amprolium i foderstoffer og forbindelser. Detektionsgrænsen er 1 mg/kg, bestemmelsesgrænsen er 25 mg/kg.

2. Princip

Prøven ekstraheres med en methanol-vand-blanding. Efter fortynding med den mobile fase og membranfiltrering bestemmes indholdet af amprolium ved kationbytter-HPLC ved anvendelse af en UV-detektor.

3. Reagenser**3.1. Methanol****3.2. Acetonitril, HPLC-renhed****3.3. Vand, HPLC-renhed****3.4. Natriumdihydrogenphosphatopløsning, $c = 0,1 \text{ mol/l}$**

Der opløses 13,80 g natriumdihydrogenphosphatmonohydrat i vand (3.3) i en 1 000 ml målekolbe; der fyldes op til mærket med vand (3.3) og blandes.

3.5. Natriumperchloratopløsning, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Der opløses 224,74 g natriumperchloratmonohydrat i vand (3.3) i en 1 000 ml målekolbe; der fyldes op til mærket med vand (3.3) og blandes.

3.6. Mobil fase til HPLC (se bemærkning 9.1)

Blanding af acetonitril (3.2), natriumdihydrogenphosphatopløsning (3.4) og natriumperchloratopløsning (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Før anvendelse filtreres der gennem et 0,22 μm membranfilter (4.3), og opløsningen afgasses (f.eks. i et ultralydbad (4.4) i mindst 15 minutter).

3.7. Standardstof ren amprolium, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)methyl]-2-methylpyridiniumchloridhydrochlorid, E 750 (se punkt 9.2)**3.7.1. Amprolium-standardstamopløsning, 500 $\mu\text{g/ml}$**

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 50 mg amprolium (3.7) i en 100 ml målekolbe, det opløses i 80 ml methanol (3.1), og kolben anbringes i 10 min i et ultralydbad (4.4). Efter ultralydbehandlung bringes opløsningen til stuetemperatur, og der fyldes op med vand til mærket og blandes. Ved en temperatur på $\leq 4^\circ\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.7.2. Sekundær amprolium-standardopløsning, 50 $\mu\text{g/ml}$

Der afpipetteres 5,0 ml af standardstamopløsningen (3.7.1) i en 50 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket med ekstraktionsopløsningsmidlet (3.8) og blandes. Ved en temperatur på $\leq 4^\circ\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.7.3. Kalibreringsopløsninger

Der overføres 0,5, 1,0 og 2,0 ml af den sekundære standardopløsning (3.7.2), til hver sin 50 ml målekolbe. Der fyldes op til mærket med den mobile fase (3.6) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 0,5, 1,0 og 2,0 μg amprolium pr. ml. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før anvendelse.

- 3.8. Ekstraktionsopløsningsmiddel
Methanol (3.1)-vand-blanding 2 + 1 (v + v)

4. Apparatur

- 4.1. HPLC-udstyr med injektionssystem, egnet til injektionsvolumener på 100 µl
- 4.1.1. Væskeskromatografisøjle, 125 mm x 4 mm, kationbytter Nucleosil 10 SA, 10 µm pakning eller tilsvarende
- 4.1.2. UV-detektor med variabel bølgelængdeindstilling eller diodearraydetektor
- 4.2. Membranfilter, PTFE-, 0,45 µm
- 4.3. Membranfilter, 0,22 µm
- 4.4. Ultralydbad
- 4.5. Mekanisk omrører eller magnetomrører

5. Fremgangsmåde

5.1. Generelt

5.1.1. Blindprøve

Til gennemførelse af genfindingstesten (5.1.2) analyseres der en blindprøve for at kontrollere, at hverken amprolium eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven bør være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og amprolium eller interfererende stoffer bør ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

En genfindingstest bør udføres ved at analysere blindprøven, hvortil der er tilsat en mængde amprolium svarende til den, som er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 100 mg/kg overføres der 10,0 ml af standardstamopløsningen (3.7.1) til en 250 ml konisk kolbe, og opløsningen indampes til cirka 0,5 ml. Der tilsættes 50 g af blindprøven og blandes grundigt, og efter henstand i 10 min blandes der igen adskillige gange, før man går videre med ekstraktionstrinet (5.2).

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som prøven til rådighed (se 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde tilsættes der til den prøve, som skal analyseres, en mængde amprolium svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-tilsatte prøve, og genfindingen kan beregnes ved subtraktion.

5.2. Ekstraktion

5.2.1. Forblandinger (indhold på < 1 % amprolium) og foderstoffer

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes der 5-40 g af prøven, afhængigt af amproliumindholdet, i en 500 ml konisk kolbe, og der tilsættes 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (3.8). Kolben anbringes i ultralydbad (4.4) og henstilles i 15 minutter. Kolben fjernes fra ultralydbadet og omrystes i 1 h på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (4.5). En prøve af ekstrakten fortyndes med den mobile fase (3.6) til et amproliumindhold på 0,5-2 µg/ml og blandes (se bemærkning 9.3). 5-10 ml af denne fortyndede opløsning filtreres på et membranfilter (4.2). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.2.2. Forblandinger (indhold på ≥ 1 % amprolium)

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes der 1-4 g af forblandingen, afhængigt af amproliumindholdet, i en 500 ml konisk kolbe, og der tilsættes 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (3.8). Kolben anbringes i ultralydbad (4.4) og henstilles i 15 minutter. Kolben fjernes fra ultralydbadet og omrystes i 1 h på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (4.5). En prøve af ekstrakten fortyndes med den mobile fase (3.6) til et amproliumindhold på 0,5-2 µg/ml og blandes. 5-10 ml af denne fortyndede opløsning filtreres på et membranfilter (4.2). Gå videre til HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametre:

De følgende betingelser er anført som retningsgivende, idet andre betingelser kan anvendes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

Væske-kromatografisøjle (4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationbytter Nucleosil 10 SA, 10 µm pakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.6):	Blanding af acetonitril (3.2), natriumdihydrogenphosphatopløsning (3.4) og natriumperchloratopløsning (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Flow:	0,7-1 ml/min.
Detektionsbølgelængde:	264 nm
Indsprøjtningens volumen:	100 µl

Stabiliteten af det kromatografiske system undersøges, idet kalibreringsopløsningen (3.7.3) med 1,0 µ/ml indsprøjtes adskillige gange, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.7.3) indsprøjtes flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes for hver koncentration. En kalibreringskurve afbildes med middeltophøjderne (-arealerne) for kalibreringsopløsningerne som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.3.3. Prøveopløsning

Prøveekstrakten (5.2) indsprøjtes adskillige gange med samme volumen som ved kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjderne (-arealerne) for amproliumtoppene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra middelhøjden (-arealet) af amproliumtoppene fra prøveopløsningen bestemmes koncentrationen af prøveopløsningen i µg/ml ud fra kalibreringskurven (5.3.2).

Amproliumindholdet w i mg/kg for prøven er givet ved følgende formel:

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

V = volumen ekstraktionsopløsningsmiddel (3.8) i ml ifølge 5.2 (dvs. 200 ml)

$\bar{c}$ = amproliumkoncentration af prøveekstrakten (5.2) i µg/ml

f = fortyndingsfaktor ifølge 5.2

m = masse af prøveportion i g

7. Validering af resultaterne

7.1. Identitet

Identiteten af analysanden kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at anvende en diodearray-detektor, med hvilken spektrene for prøveekstrakten (5.2) og kalibreringsopløsningen (3.7.3) med 2,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

En prøveekstrakt (5.2) tilsættes en passende mængde kalibreringsopløsning (3.7.3). Den tilsatte mængde amprolium bør svare til den mængde amprolium, som er fundet i prøveekstrakten.

Kun højden af amproliumtoppen må være blevet forstærket, når der tages højde for både den tilsatte mængde og fortynding af ekstrakten. Topbredden i den halve højde skal være inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde af amproliumtoppen for den uforstærkede prøveekstrakt.

7.1.2. Diodearray-detektion

Resultaterne vurderes i forhold til følgende kriterier:

- Bølgelængden for prøvens absorptionsmaksimum og for standardspektre, registreret ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin bestemt af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearray-detektion er denne typisk inden for ± 2 nm.
- Mellem 210 og 320 nm må prøve- og standardspektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige for disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalysandens absorptions.
- Mellem 210 og 320 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstrakten ikke være forskellige fra hinanden for disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem de to spektre i alle observerede punkter ikke overstiger 15 % af absorptionsen for spektret i toppens spids.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analysandens tilstedeværelse ikke blevet bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem to parallelbestemmelser udført på den samme prøve må ikke overstige

- 15 % i forhold til den største værdi for amproliumindhold fra 25 mg/kg til 500 mg/kg
- 75 mg/kg for amproliumindhold mellem 500 mg/kg og 1 000 mg/kg
- 7,5 % i forhold til den største værdi for amproliumindhold på mere end 1 000 mg/kg

7.3. Genfinding

For en tilsat (blind)prøve skal genfindingen være mindst 90 %.

8. Resultater fra en ringanalyse

Der er gennemført en ringanalyse, hvori tre kyllingefodere (prøve 1-3), et mineralfoder (prøve 4) og en forblanding (prøve 5) blev analyseret. Resultaterne er vist i følgende tabel

	Prøve 1 (blindprøve)	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
midelværdi [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
nominelt indhold [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: antal laboratorier

n: antal enkeltværdier

s_r : standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r : variationskoefficient for repeterbarhed

s_R : standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R : variationskoefficient for reproducerbarhed

9. Bemærkninger

- 9.1. Hvis prøven indeholder thiamin, forekommer thiamintoppen i kromatogrammet kort før amproliumtoppen. Ved at følge denne metode skal amprolium og thiamin adskilles. Hvis amprolium og thiamin ikke adskilles med den søjle (4.1.1), der anvendes i denne metode, erstattes op til 50 % af acetonitrildelen af den mobile fase (3.6) med methanol.
- 9.2. Ifølge British Pharmacopoeia viser spektret for en amproliumopløsning ($c = 0,02$ mol/l) i saltsyre ($c = 0,1$ mol/l) maksima ved 246 nm og 262 nm. Absorbansen skal være 0,84 ved 246 nm og 0,80 ved 262 nm.
- 9.3. Ekstrakten skal altid fortyndes med den mobile fase, da retentionstiden for amproliumtoppen ellers kan forskydes væsentligt på grund af ændringer i ionstyrken.

DEL B**BESTEMMELSE AF DICLAZURIL**

2,6 chloro-alpha-(4-chlorophenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]-benzen acetonitril

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden er til bestemmelse af diclazuril i foderstoffer og blandinger. Detektionsgrænsen er 0,1 mg/kg, bestemmelsesgrænsen er 0,5 mg/kg.

2. Princip

Efter tilsætning af en intern standard ekstraheres prøven med sur methanol. For foderstoffers vedkommende renses en prøve af ekstrakten på en fastfase C18-ekstraktionspatron. Diclazuril elueres fra patronen med en blanding af syret methanol og vand. Efter inddampning opløses resten i DMF/vand. For blandingers vedkommende inddampes ekstrakten, og resten opløses i DMF/vand. Indholdet af diclazuril bestemmes ved ternær gradient- HPLC i omvendt fase ved anvendelse af en UV-detektor.

3. Reagenser

- 3.1. Vand, HPLC-renhed
- 3.2. Ammoniumacetat
- 3.3. Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBHS)
- 3.4. Acetonitril, HPLC-renhed
- 3.5. Methanol, HPLC-renhed
- 3.6. N,N-dimethylformamid (DMF)
- 3.7. Saltsyre, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml
- 3.8. Standardstof: diclazuril II-24: 2,6 chloro-alpha-(4-chlorophenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]-benzen acetonitril med garanteret renhed, E771.
- 3.8.1. Diclazuril-standardstamløsning, 500 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 25 mg diclazuril-standardstof (3.8) i en 50 ml målekolbe. Der opløses i DMF (3.6), fyldes op til mærket med DMF (3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opbevaring skal ske i køleskab. Ved en temperatur på $\leq 4^\circ\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.8.2. Diclazuril-standardopløsning, 50 µg/ml

Der overføres 5,00 ml af standardstamopløsningen (3.8.1.) til en 50 ml målekolbe, fyldes op til mærket med DMF (3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opbevaring skal ske i køleskab. Ved en temperatur på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.9. Internt standardstof: 2,6-dichlor- α -(4-chlorphenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)-yl)- α -methylbenzenacetonitril.

3.9.1. Intern standardstamopløsning, 500 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 25 mg internt standardstof (3.9) i en 50 ml målekolbe. Der opløses i DMF (3.6), fyldes op til mærket med DMF (3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opbevaring skal ske i køleskab. Ved en temperatur på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.9.2. Intern standardopløsning, 50 µg/ml

Der overføres 5,00 ml af den interne standardstamopløsning (3.9.1) til en 50 ml målekolbe, fyldes op til mærket med DMF (3.6) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opbevaring skal ske i køleskab. Ved en temperatur på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.9.3. Intern standardopløsning for forblandinger, p/1 000 mg/ml (p = nominelt indhold af diclazuril i forblandingen i mg/kg)

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes p/10 mg af det interne standardstof i en 100 ml målekolbe. Der opløses i DMF (3.6) i et ultralydbad (4.6), fyldes op til mærket med DMF og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes en brun kolbe, og opbevaring skal ske i køleskab. Ved en temperatur på $\leq 4^{\circ}\text{C}$ er opløsningen stabil i en måned.

3.10. Kalibreringsopløsning, 2 µg/ml

Der afpipetteres 2,00 ml diclazuril-standardopløsning (3.8.2) og 2,00 ml intern standardopløsning (3.9.2) i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 16 ml DMF (3.6), fyldes op til mærket med vand og blandes. Denne opløsning skal fremstilles frisk før anvendelse.

3.11. C18-fastfase ekstraktionspatron, f.eks. Bond Elut, størrelse: 1 cm³, sorbentmasse: 100 mg.

3.12. Ekstraktionsopløsningsmiddel: sur methanol.

Der afpipetteres 5,0 ml saltsyre (3.7) i 1 000 ml methanol (3.5) og blandes.

3.13. Mobil fase til HPLC

Eluent A: ammoniumacetat-tetrabutylammoniumhydrogensulfat-opløsning

3.13.1. Der opløses 5 g ammoniumacetat (3.2) og 3,4 g TBHS (3.3) i 1 000 ml vand (3.1) og blandes.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (3.4)

3.13.3. Eluent C: methanol (3.5)

4. Apparat

4.1. Mekanisk rysteapparat

4.2. Udstyr til ternær gradient-HPLC

4.2.1. Væskekromatografisøjle, Hypersil ODS, 3 µm pakning, 100 mm x 4,6 mm, eller tilsvarende

4.2.2. UV-detektor med variabel bølglængdeindstilling eller diodearray-detektor

4.3. Vakuumsrotationsinddamper

4.4. Membranfilter, 0,45 µm

4.5. Vakuumanifold

4.6. Ultralydbad

5. Fremgangsmåde

5.1. Generelt

5.1.1. Blindprøve

Der bør analyseres en blindprøve for at kontrollere, at hverken diclazuril eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven bør være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og ved analyse bør diclazuril eller interfererende stoffer ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

En genfindingstest bør udføres ved at analysere blindprøven, hvortil der er tilsat en mængde diclazuril svarende til den, som er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 1 mg/kg tilsættes der 0,1 ml af standardstamopløsningen (3.8.1) til 50 g af en blindprøve, der blandes grundigt, og efter henstand i 10 minutter blandes igen adskillige gange, før man går videre (5.2).

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som prøven til rådighed (se 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde tilsættes der til den prøve, som skal analyseres, en mængde diclazuril svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-tilsatte prøve, og genfindingen kan beregnes ved subtraktion.

5.2. Ekstraktion

5.2.1. Foderstoffer

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes cirka 50 g af prøven. Det overføres til en 500 ml konisk kolbe, der tilsættes 1,00 ml intern standardopløsning (3.9.2) og 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (3.12), og kolben tilproppes. Blandingen rystes på rysteapparatet (4.1) natten over. Man lader bundfaldet sætte sig ved henstand i 10 minutter. En 20 ml prøve af supernatanten overføres til en egnet glasbeholder og fortyndes med 20 ml vand. Denne opløsning overføres til en ekstraktionspatron (3.11) og ledes igennem ved hjælp af vakuum (4.5). Patronen vaskes med 25 ml af en blanding af ekstraktionsopløsningsmiddel (3.12) og vand, 65 + 35 (V + V). De opsamlede fraktioner bortkastes, og forbindelserne elueres med 25 ml af en blanding af ekstraktionsopløsningsmiddel (3.12) og vand, 80 + 20 (V + V). Denne fraktion inddampes, indtil den netop når tørhed, ved hjælp af rotationsinddamperen (4.3) ved 60 °C. Resten opløses i 1,0 ml DMF (3.6), og der tilsættes 1,5 ml vand (3.1) og blandes. Der filtreres gennem et membranfilter (4.4). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.2.2. Forblandinger

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes der cirka 1 g prøve. Den overføres til en 500 ml konisk kolbe, der tilsættes 1,00 ml intern standardopløsning (3.9.3) og 200 ml ekstraktionsopløsningsmiddel (3.12), og kolben tilproppes. Der omrystes natten over på rysteapparatet. Man lader bundfaldet sætte sig ved henstand i 10 minutter. En 10 000/p ml (p = nominelt indhold af diclazuril i forblandingen i mg/kg) prøve af supernatanten overføres til en rundbundet kolbe af passende størrelse. Der inddampes, indtil den netop når tørhed, under reduceret tryk ved hjælp af rotationsinddamperen (4.3) ved 60 °C. Resten genopløses i 10,0 ml DMF (3.6), og der tilsættes 15,0 ml vand (3.1) og blandes. Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametre

De følgende betingelser er anført som retningsgivende, idet andre betingelser kan anvendes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

— Væskekromatografisøjle (4.2.1):	Hypersil ODS, 100 mm × 4,6 mm, 3 µm pakning, eller tilsvarende
— Mobil fase:	Eluent A (3.13.1): Vandig opløsning af ammoniumacetat og tetrabutylammoniumhydrogensulfat
	Eluent B (3.13.2): acetonitril
	Eluent C (3.13.3): methanol

- Elueringsmåde: — lineær gradient
- startbetingelser: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (V + V + V)
- efter 10 minutter gradienteluering i 30 minutter til: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V)
- Der skylles med B i 10 minutter.
- Strømningshastighed: 1,5-2 ml/min
- Indsprøjtningens volumen: 20 µl
- Detektorbølgelængde: 280 nm

Stabiliteten af det kromatografiske system undersøges ved adskillige gange at indsprøjte kalibreringsopløsningen (3.10) med 2 µg/ml, indtil der opnås konstante tophøjder og retentionstider.

5.3.2. Kalibreringsopløsning

Der indsprøjtes 20 µl af kalibreringsopløsningen (3.10) adskillige gange, og middeltophøjden (-arealet) af toppene for diclazuril og intern standard bestemmes.

5.3.3. Prøveopløsning

Der indsprøjtes 20 µl af prøveopløsningen (5.2.1. eller 5.2.2.) adskillige gange, og middeltophøjden (-arealet) af toppene for diclazuril og intern standard bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

6.1. Foderstoffer

Diclazurilindholdet w (mg/kg) i prøven er givet ved den følgende formel

$$w = \frac{h_{ds} \cdot h_{ic} \cdot \delta_{dc} \cdot 10V}{h_{is} \cdot h_{dc} \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

hvor

- h_{ds} = tophøjde (areal) for diclazuril i prøveopløsningen (5.2.1)
- h_{is} = tophøjde (areal) for den interne standard i prøveopløsningen (5.2.1)
- h_{dc} = tophøjde (areal) for diclazuril i kalibreringsopløsningen (3.10)
- h_{ic} = tophøjde (areal) for den interne standard kalibreringsopløsningen (3.10)
- δ_{dc} = diclazurilkoncentration i kalibreringsopløsningen i µg/ml (3.10)
- m = masse af testportion i g
- V = volumen af prøveekstrakten ifølge 5.2.1 (dvs. 2,5 ml)

6.2. Forblandinger

Diclazurilindholdet w (mg/kg) i prøven er givet ved følgende formel:

$$w = \frac{h_{ds} \cdot h_{ic} \cdot \delta_{dc} \cdot 0,02V \cdot p}{h_{is} \cdot h_{dc} \cdot m} \text{ [mg/kg]}$$

hvor

- h_{dc} = tophøjde (areal) for diclazuril i kalibreringsopløsningen (3.10)
- h_{ic} = tophøjde (areal) for den interne standard i kalibreringsopløsningen (3.10)
- h_{ds} = tophøjde (areal) for diclazuril i prøveopløsningen (5.2.2)
- h_{is} = tophøjde (areal) for den interne standard i prøveopløsningen (5.2.2)
- δ_{dc} = diclazurilkoncentration i kalibreringsopløsningen (3.10)
- m = masse af prøveportionen i g
- V = Volumen af prøveekstrakten ifølge 5.2.2 (dvs. 25 ml)
- p = nominelt indhold af diclazuril i mg/kg i forblandingen

7. Validering af resultaterne

7.1. Identitet

Identiteten af analysanden kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at anvende en diodearray-detektor, med hvilken spektrene for prøveekstrakten (5.2.1 eller 5.2.2) og kalibreringsopløsningen (3.10) sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

En prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) tilsættes en passende mængde kalibreringsopløsning (3.10). Den tilsatte mængde diclazuril bør svare til den mængde diclazuril, som er fundet i prøveekstrakten.

Kun højden af diclazuriltoppen og den interne standard må være blevet forstærket, når der tages højde for både den tilsatte mængde og fortynding af ekstrakten. Topbredden skal i den halve højde ligge inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde af diclazuriltoppen eller intern standard-toppen for den ikke-tilsatte prøveekstrakt.

7.1.2. Diodearray-detektion

Resultaterne vurderes i forhold til de følgende kriterier:

- a) Bølgelængden for prøvens absorptionsmaksimum og for standardspektre, registreret ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin bestemt af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearray-detektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.
- b) Mellem 230 og 320 nm må prøve- og standardspektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellig for disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalysandens absorptions.
- c) Mellem 230 og 320 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstrakten ikke være forskellige fra hinanden for disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem spektrene i alle observerede punkter ikke overstiger 15 % af absorptionsen for spektret i toppens spids.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analysandens tilstedeværelse ikke blevet bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem to parallelbestemmelser udført på den samme prøve må ikke overstige

- 30 % i forhold til den største værdi for diclazurilindhold fra 0,5 mg/kg til 2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg for diclazurilindhold mellem 2,5 mg/kg og 5 mg/kg
- 15 % i forhold til den største værdi for diclazurilindhold på mere end 5 mg/kg

7.3. Genfinding

For en tilsat (blind)prøve skal genfindingen være mindst 80 %.

8. Resultater fra en ringanalyse

Der er gennemført en ringanalyse, hvori 5 prøver blev analyseret af 11 laboratorier. Disse prøver bestod af to forblandinger; den ene var blandet med en organisk matrix (O 100) og den anden med en uorganisk matrix (A 100). Det teoretiske indhold var 100 mg diclazuril pr. kg. De tre blandede kyllingefodere var fremstillet af tre forskellige producenter (NL) (L1/Z1/K1). Det teoretiske indhold var 1 mg diclazuril pr. kg. Laboratorierne blev instrueret om at analysere hver af prøverne én gang eller som dobbeltbestemmelse (*Journal of AOAC International*, bind 77, nr. 6, 1994, s. 1359-1361, indeholder nærmere oplysninger om denne ringprøve). Resultaterne er anført i følgende tabel:

	Prøve 1 A 100	Prøve 2 O 100	Prøve 3 L 1	Prøve 4 Z 1	Prøve 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Middelværdi	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
Nominelt indhold (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: antal laboratorier

n: antal enkeltværdier

S_r : standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r : variationskoefficient for repeterbarhed

S_R : standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R : variationskoefficient for reproducerbarhed

9. Bemærkninger

Diclazurilresponsen skal tidligere være påvist at være lineær i de koncentrationsområder, hvori der måles.

Del C

BESTEMMELSE AF CARBADOX

Methyl 3-(2-quinoxalinylmethylen)carbazat- N,N -dioxid

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden er til bestemmelse af carbadox i foderstoffer, forblandinger og tilberedninger. Detektionsgrænsen er 1 mg/kg. Bestemmelsesgrænsen er 10 mg/kg.

2. Princip

Prøven bringes i ligevægt med vand og ekstraheres med methanol-acetonitril. For foderstoffers vedkommende oprenses en prøveportion af den filtrerede ekstrakt på en aluminiumoxidsøjle. For forblandingers og tilberedningers vedkommende fortyndes en prøveportion af den filtrerede ekstrakt til en passende koncentration med vand, methanol og acetonitril. Indholdet af carbadox bestemmes ved HPLC i omvendt fase ved anvendelse af en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, HPLC-renhed

3.3. Eddikesyre, w = 100 %

3.4. Aluminiumoxid: neutral, aktivitetskvalitet I

3.5. Methanol-acetonitril 1 + 1 (v + v)

500 ml methanol (3.1) blandes med 500 ml acetonitril (3.2).

3.6. Eddikesyre, σ = 10 %

10 ml eddikesyre (3.3) fortyndes til 100 ml med vand.

3.7. Natriumacetat, CH_3COONa

- 3.8. Vand, HPLC-renhed
- 3.9. Acetatpufferopløsning, $c = 0,01$ mol/l, pH = 6,0
- 0,82 g natriumacetat (3.7) opløses i 700 ml vand (3.8), og pH indstilles til 6,0 med eddikesyre (3.6). Overføres til en 1 000 ml målekolbe, fyldes op til mærket med vand (3.8) og blandes.
- 3.10. Mobil fase til HPLC
- 825 ml acetatpufferopløsning (3.9) blandes med 175 ml acetonitril (3.2). Der filtreres gennem et 0,22 μm filter (4.5), og opløsningen afgasses (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).
- 3.11. Standardstof
- Ren carbadox: Methyl-3-(2-quinoxalinylmethylen)carbazat- N^1, N^4 -dioxid, E 850
- 3.11.1. Carbadox-standardstamopløsning, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (se anm. under 5. Fremgangsmåde)
- Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 25 mg carbadoxstandardstof (3.11) i en 250 ml målekolbe. Det opløses i methanol-acetonitril (3.5) ved ultralydbehandling (4.7). Efter ultralydbehandling bringes opløsningen til stuetemperatur, og der fyldes op til mærket med methanol-acetonitril (3.5) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie, eller der anvendes brunt glasudstyr, og opbevaring skal ske i køleskab. Denne opløsning er stabil i en måned ved en temperatur på $\leq 4^\circ\text{C}$.
- 3.11.2. Kalibreringsopløsninger
- 2,0, 5,0, 10,0 og 20,0 ml af standardstamopløsningen (3.11.1) overføres til hver sin 100 ml målekolbe. Der tilsættes 30 ml vand, fyldes op til mærket med methanol-acetonitril (3.5) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 2,0, 5,0, 10,0 og 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbadox. Kalibreringsopløsninger skal fremstilles frisk før anvendelse.
- Anm.:* Til bestemmelse af carbadox i foderstoffer, som indeholder mindre end 10 mg/kg, skal der fremstilles kalibreringsopløsninger med en koncentration på under 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 3.12. Vand-[methanol-acetonitril] (3.5)-blanding, 300 + 700 (v + v)
- 300 ml vand blandes med 700 ml af blandingen af methanol-acetonitril (3.5).
4. **Apparatur**
- 4.1. Laboratorierysteapparat eller magnetomrører
- 4.2. Glasfiberfilterpapir (Whatman GF/A eller tilsvarende)
- 4.3. Glassøjle (længde fra 300 til 400 mm, indvendig diameter på cirka 10 mm) med sintret glasfritte og aftapningsventil.
- Anm.:* der kan også anvendes en glassøjle med hane eller en glassøjle med en tilspidset ende; i dette tilfælde indsættes en lille glasuldsprop i den nedre ende, og den bankes ned med en glasstav.
- 4.4. HPLC-udstyr med injektionssystem egnet til injektionsvolumener på 20 μl
- 4.4.1. Væskekromatografisøjle: 300 mm x 4 mm, C18, 10 μm pakning eller tilsvarende
- 4.4.2. UV-detektor med variabel bølglængdeindstilling eller diodearray-detektor, som arbejder i området fra 225 til 400 nm
- 4.5. Membranfilter, 0,22 μm
- 4.6. Membranfilter, 0,45 μm
- 4.7. Ultralydbad
5. **Fremgangsmåde**
- Anm.:* Carbadox er lysfølsomt. Alle procedurer udføres i dæmpet lys, eller der anvendes brunt glasudstyr eller glasudstyr omviklet med aluminiumfolie.
- 5.1. *Generelt*

5.1.1. Blindprøve

Til gennemførelse af genfindingstesten (5.1.2) analyseres der en blindprøve for at kontrollere, at hverken carbadox eller interfererende stoffer er til stede. Blindprøven bør være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og ved analyse bør carbadox eller interfererende stoffer ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

En genfindingstest bør udføres ved at analysere blindprøven (5.1.1), hvortil der er tilsat en mængde carbadox svarende til den, som er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 50 mg/kg overføres der 5,0 ml af standardstamopløsningen (3.11.1) til en 200 ml konisk kolbe. Opløsningen inddampes til cirka 0,5 ml i en nitrogenstrøm. Der tilsættes 10 g af blindprøven, blandes og ventes i 10 minutter, før man går videre med ekstraktionstrinet (5.2).

Hvis der ikke er en blindprøve af samme type som prøven til rådighed (se punkt 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde tilsættes der til prøven en mængde carbadox svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med den ikke-tilsatte prøve, og genfindingen kan beregnes ved subtraktion.

5.2. *Ekstraktion*

5.2.1. Foderstoffer

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes cirka 10 g af prøven, som overføres til en 200 ml konisk kolbe. Der tilsættes 15,0 ml vand og blandes, og blandingen henstår i 5 minutter. Der tilsættes 35,0 ml methanol-acetonitril (3.5), tilproppes og omrystes i 30 minutter på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (4.1). Opløsningen filtreres gennem et glasfiberfilterpapir (4.2). Denne opløsning gemmes til oprensningstrinet (5.3).

5.2.2. Forblandinger (0,1-2,0 %)

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes cirka 1 g af den uformalede prøve, som overføres til en 200 ml konisk kolbe. Der tilsættes 15,0 ml vand og blandes, og blandingen henstår i 5 minutter. Der tilsættes 35,0 ml methanol-acetonitril (3.5), tilproppes og omrystes i 30 minutter på rysteapparatet eller omrøres på magnetomrøreren (4.1). Opløsningen filtreres gennem et glasfiberfilterpapir (4.2). En prøve af filtratet afpipetteres i en 50 ml målekolbe. Der tilsættes 15,0 ml vand, fyldes op til mærket med methanol-acetonitril (3.5) og blandes. Carbadoxkoncentrationen af den endelige opløsning skal være cirka 10 µg/ml. En prøve filtreres gennem et 0,45 µm filter (4.6). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.2.3. Forblandinger (> 2 %)

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes cirka 0,2 g af den uformalede prøve, som overføres til en 250 ml konisk kolbe. Der tilsættes 45,0 ml vand og blandes, og blandingen henstår i 5 minutter. Der tilsættes 105,0 ml methanol-acetonitril (3.5), tilproppes og homogeniseres. Prøven lydbehandles (4.7) i 15 minutter efterfulgt af omrystning eller omrøring i 15 minutter (4.1). Opløsningen filtreres gennem et glasfiberfilterpapir (4.2). En prøve af filtratet fortyndes med blandingen af vand-methanol-acetonitril (3.12) til en endelig carbadoxkoncentration på 10-15 µg/ml (for en 10 % forblending er fortyndingsfaktoren 10). En prøve filtreres gennem et 0,45 µm filter (4.6). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.3. *Oprensning*

5.3.1. Fremstilling af aluminiumoxidsøjlen

Der afvejes 4 g aluminiumoxid (3.4), som overføres til glassøjlen (4.3).

5.3.2. Prøveoprensning

Der sættes 15 ml af den filtrerede ekstrakt (5.2.1) på aluminiumoxidsøjlen, og de første 2 ml eluat kasseres. De næste 5 ml opsamles, og en prøve filtreres gennem et 0,45 µm filter (4.6). Der fortsættes med HPLC-bestemmelse (5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse

5.4.1. Parametre

De følgende betingelser er anført som retningsgivende, idet andre betingelser kan anvendes, forudsat at de giver tilsvarende resultater.

Væskerkromatografisøjle (4.1.1):	300 mm × 4 mm, C18, 10 µm pakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.10):	Blanding af acetatpufferopløsning (3.9) og acetonitril (3.2), 825 + 175 (v + v)
Strømningshastighed:	1,5-2 ml/min
Detektionsbølgelængde:	365 nm
Indsprøjtningens volumen:	20 µl

Stabiliteten af det kromatografiske system undersøges ved at indsprøjte kalibreringsopløsningen (3.11.2) med 5,0 µg/ml adskillige gange, indtil der opnås konstante tophøjder (-arealer) og retentions-tider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.11.2) indsprøjtes adskillige gange, og tophøjderne (-arealerne) måles for hver koncentration. En kalibreringskurve afbildes med middeltophøjderne eller -arealerne for kalibreringsopløsningerne som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.4.3. Prøveopløsning

Prøveekstrakten ((5.3.2) for foderstoffer, (5.2.2) for forblandinger og (5.2.3) for præparationer) indsprøjtes adskillige gange, og middeltophøjden (-arealet) for carbadoxtoffene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra middelhøjden (-arealet) af carbadoxtoffene fra prøveopløsningen bestemmes koncentrationen af prøveopløsningen i µg/ml ud fra kalibreringskurven (5.4.2).

6.1. Foderstoffer

Indholdet af carbadox w (mg/kg) i prøven er givet ved følgende formel:

$$w = \frac{\bar{c} \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

hvor

$\bar{c}$ = carbadoxkoncentration i prøveekstrakt (5.3.2) i µg/ml

V_1 = ekstraktionsvolumen i ml (dvs. 50)

m = masse af prøveportion i g

6.2. Forblandinger og præparater

Indholdet af carbadox w (mg/kg) i prøven er givet ved følgende formel:

$$w = \frac{\bar{c} \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

hvor

$\bar{c}$ = carbadoxkoncentration i prøveekstraktet (5.2.2 eller 5.2.3) i µg/ml

V_2 = ekstraktionsvolumen i ml (dvs. 50 for forblandinger; 150 for præparater)

f = fortyndingsfaktor ifølge 5.2.2 (forblandinger) eller 5.2.3 (præparater)

m = masse af prøveportion i g

7. Validering af resultater

7.1. Identitet

Identiteten af analysanden kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at anvende en diodearray-detektor, med hvilken spektrene for prøveekstrakten og kalibreringsopløsningen (3.11.2) med 10,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

En prøveekstrakt tilsættes en passende mængde kalibreringsopløsning (3.11.2). Den tilsatte mængde carbadox bør svare til den skønnede mængde carbadox, som er fundet i prøveekstrakten.

Kun højden af carbadoxtoppen må være blevet forstærket, når der tages højde for både den tilsatte mængde og fortynding af ekstrakten. Topbredden i den halve højde skal ligge inden for cirka 10 % af den oprindelige bredde.

7.1.2. Diodearray-detektion

Resultaterne vurderes i forhold til følgende kriterier:

- Bølgelængden for prøvens absorptionsmaksimum og for standardspektre, registreret ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin bestemt af detektionssystemets opløsningsevne. For diodearray-detektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.
- Mellem 225 og 400 nm må prøve- og standardspektre registreret ved toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellig for disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem de to spektre i intet observeret punkt overstiger 15 % af standardanalysandens absorbans.
- Mellem 225 og 400 nm må spektrene ved toppens forside, spids og bagside frembragt med prøveekstrakten ikke være forskellige fra hinanden i disse dele af spektret i området 10-100 % relativ absorbans. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når afvigelsen mellem spektrene i alle observerede punkter ikke overstiger 15 % af absorbansen for spektret i toppens spids.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er analysandens tilstedeværelse ikke blevet bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

For indhold på 10 mg/kg og derover må forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser udført på den samme prøve ikke overstige 15 % i forhold til den største værdi.

7.3. Genfinding

For en tilsat (blind)prøve skal genfindingen være mindst 90 %.

8. Resultater fra en ringanalyse

Der er gennemført en ringanalyse, hvori seks foderstoffer, fire forblandinger og tre præparater blev analyseret af otte laboratorier. Der blev udført dobbeltbestemmelse på hver prøve (Journal of AOAC bind 71, 1988, s. 484-490, indeholder nærmere oplysninger om denne ringanalyse). Resultaterne (bortset fra outliers) er vist nedenfor:

Tabel 1. Resultater fra ringanalyse af foderstoffer

	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4	Prøve 5	Prøve 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Middelværdi (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	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
Nominelt indhold (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabel 2. Resultater fra ringanalyse af forblandinger og præparater

	Forblandinger				Præparater		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Middelværdi (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_i (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_i (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/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
Nominelt indhold (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: antal laboratorier

n: antal enkeltværdier

 s_i : standardafvigelse for repeterbarhed CV_i : variationskoefficient for repeterbarhed S_R : standardafvigelse for reproducerbarhed CV_R : variationskoefficient for reproducerbarhed