

KOMMISSIONENS TOLVTE DIREKTIV 93/117/EF

af 17. december 1993

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

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 forordning
(EØF) nr. 3768/85⁽²⁾, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved direktiv 90/373/EØF er det fastsat, at den officielle
kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betin-
gelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved
lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaf-
fenhed og sammensætning er opfyldt, foretages efter
fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

for at det kan kontrolleres, om betingelserne for at
anvende robenidin og methylbenzoquat i foderstoffer
overholdes, bør der fastsættes en fællesskabsanalysemetode
for dette tilsætningsstof;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overens-
stemmelse med udtalelse fra Den Stående Foderstofko-
mité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse
med den officielle kontrol af foderstoffer, for så vidt angår

deres indhold af robenidin og methylbenzoquat, skal fore-
tages efter den metode, der er beskrevet i bilaget.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter senest den 30. november 1994 de
nødvendige ved lov eller administrativt fastsatte bestem-
melser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette
direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Når medlemsstaterne vedtager disse bestemmelser,
henvises der deri til dette direktiv, eller de ledsages ved
offentliggørelsen af en sådan henvisning. De nærmere
regler for denne henvisning fastsættes af medlemsstaterne.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Dette direktiv træder i kraft på tredjedagen for dets offent-
liggørelse i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Udfærdiget i Bruxelles, den 17. december 1993.

På Kommissionens vegne

René STEICHEN

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. L 170 af 3. 8. 1970, s. 2.

⁽²⁾ EFT nr. L 362 af 31. 12. 1985, s. 8.

BILAG

1. BESTEMMELSE AF ROBENIDIN

1,3-Bis((4-chlorobenzyliden)amino) guanidinhydrochlorid

1. Formål og anvendelsesområde

Dette er en metode til bestemmelse af robenidin i foderstoffer. Den nedre bestemmelsesgrænse er 5 mg/kg.

2. Princip

Prøven ekstraheres med sur methanol. Ekstraktet tørres, og en alikvot mængde renses i en søjle indeholdende aluminiumoxid. Robenidinet elueres fra søjlen med koncentreret methanol, og rumfanget øges i passende grad ved tilsætning af mobil fase. Indholdet af robenidin bestemmes ved omvendt-fase HPLC ved anvendelse af en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. *Methanol*3.2. *Sur methanol*

4,0 ml saltsyre (P₂₀ ca. 1,18 g/ml) overføres til en 500 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (3.1) og blandes. Denne opløsning tilberedes umiddelbart før brug.

3.3. *Acetonitril, HPLC-kvalitet*3.4. *Molekularsieve*

Type 3A, 8-12 mesh (1,6-2,5 mm kugler, krystallinsk aluminiumsilikat, porediameter 0,3 nm).

3.5. *Aluminiumoxid: sur, aktivitetsgrad I før søjlekromatografi*

100 g aluminiumoxid overføres til en egnet beholder, og der tilsættes 2,0 ml vand. Beholderen tilproppes og omrystes i ca. 20 minutter. Væsken opbevares i en godt tilproppet beholder.

3.6. *Kaliumhydrogenphosphatopløsning, c = 0,025 mol/l*

3,40 g kaliumdihydrogenphosphat opløses i vand (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket og blandes.

3.7. *Dinatriumhydrogenphosphatopløsning, c = 0,025 mol/l*

3,55 g vandfri (eller 4,45 dihydrat eller 8,95 g dodecahydrat) dinatriumhydrogenphosphat opløses i vand (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket og blandes.

3.8. *HPLC mobil fase*

Følgende reagenser blandes:

650 ml acetonitril (3.3)

250 ml vand (HPLC-kvalitet)

50 ml kaliumdihydrogenphosphatopløsning (3.6)

50 ml dinatriumhydrogenphosphatopløsning (3.7)

Der filtreres gennem et 0,22 µm filter (4.6), og opløsningen udluftes (f.eks. ved ultralydsbehandling i ti minutter).

3.9. *Standard*

Ren robenidin: 1,3-Bis((4-chlorobenzyliden)amino)guanidinhydrochlorid E 758

3.9.1. Robenidinstamopløsning : 300 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 30 mg robenidinstandard (3.9) og opløses i syrnethanol (3.2) i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med samme opløsning og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i mørke.

3.9.2. Robenidinstandardopløsning : 12 µg/ml

10,0 ml af stamopløsningen (3.9.1) overføres til en 250 ml målekolbe, hvorefter der fyldes til mærket med mobil fase (3.8) og blandes. Kolben omvikles med aluminiumfolie og opbevares i mørke.

3.9.3. Kalibreringsopløsninger

Til en række 50 ml målekolber overføres henholdsvis 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 og 25,0 ml af standardopløsningen (3.9.2). Der fyldes op til mærket med mobil fase (3.8) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 og 6,0 µg/ml robenidin pr. ml. Disse opløsninger tilberedes umiddelbart før brug.

4. Apparatur**4.1. Glassøjle**

Fremstillet af brunt glas og forsynet med stophane og med et rumfang på ca. 150 ml, indvendig diameter 10-15 mm, længde 250 mm.

4.2. Laboratoire «wrist-action» ryster**4.3. Rotationsinddamper****4.4. HPLC-udstyr med UV-detektor med variabel bølgelængde eller diodearraydetektor, som arbejder inden for området 250-400 nm****4.4.1. Væskeskromatografisøjle : 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm pakning eller tilsvarende****4.5. Glasfiberfiltrerpapir (Whatman GF/A eller tilsvarende)****4.6. Membranfiltre, 0,22 µm****4.7. Membranfiltre, 0,45 µm****5. Fremgangsmåde**

NB : Robenidin er lysfølsomt. Der bør anvendes brunt glasmateriel ved alle operationer.

5.1. Generelt**5.1.1. En blindprøve analyseres for at kontrollere, at der hverken er robenidin eller andre interfererende stoffer til stede.****5.1.2. Genfindelsen kontrolleres ved at analysere blindprøven (5.1.1), der tilsættes robenidin i en mængde svarende til analyseprøvens indhold. For at tilsætte 60 mg/kg, tilsættes 3,0 ml af stamopløsningen (3.9.1) til en 250 ml konisk kolbe. Opløsningen inddampes til ca. 0,5 ml i en strøm af nitrogen. Tilsæt 15 g af blindprøven, bland og vent ti minutter før der fortsættes med ekstraktion (5.2).**

Fodnote : Til denne metode anvendes en blindprøve, af samme type som analyseprøven, og som ved analyse viser sig ikke at indeholde robenidin.

5.2. Ekstraktion

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes ca. 15 g af den tilberedte prøve, overføres til en 250 ml konisk kolbe og tilsættes 100,0 ml sur methanol (3.2), hvorefter kolben tilproppes og rystes i en time på shakeren (4.2). Opløsningen filtreres gennem et glasfiberfiltrerpapir (4.5), og hele filtratet opsamles i en 150 ml konisk kolbe. Der tilsættes 7,5 mg molecularsieve (3.4), tilproppes og omrystes i fem minutter. Derefter filtreres omgående gennem et glasfiberfiltrerpapir. Denne opløsning anvendes til oprensningsprocessen (5.3).

5.3. Oprensning

5.3.1. Forberedelse af aluminiumoxid-søjlen

En lille prop af glasuld anbringes i den nederste ende af en glassøjle (4.1) og skubbes helt ned med en glasstang. 11,0 g af den forberedte aluminiumoxid (3.5) afvejes og overføres til søjlen. Man må omhyggeligt passe på at mindske luftens adgang under dette stadium. Der bankes let på søjlens nederste ende for at få aluminiumoxidet til at sætte sig.

5.3.2. Oprensning af prøven

Med pipette overføres 5,0 ml af det under (5.2) forberedte prøveekstrakt til søjlen. Man holder spidsen af pipetten nær søjlevæggen og lader opløsningen absorberes af aluminiumoxidet. Robenidin elueres fra søjlen under anvendelse af 100 ml methanol (3.1) med en gennemstrømningshastighed på 2-3 ml/min., og eluatet opsamles i en 250 ml rundbundet kolbe. Methanoloopløsningen indampes til tørhed under nedsat tryk ved 40 °C ved hjælp af en rotationsinddampner (4.3). Remanensen opløses i 3-4 ml mobil fase (3.8) og overføres kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Kolben skylles med flere portioner på 1-2 ml mobil fase, som overføres til målekolben. Der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes. En alikvot mængde filtreres gennem et 0,45 µm filter (4.7). Denne opløsning gemmes til HPLC-bestemmelsen (5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse

5.4.1. Parametre

Følgende betingelser er vejledende. Andre betingelser kan bruges, såfremt de giver de samme resultater:

HPLC-kolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.8)

Flowhastighed: 1,5-2 ml/min.

Detektorbølgelængde: 317 nm

Injektionsvolumen: 20-50 µl.

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres ved, at der flere gange injiceres kalibreringsopløsning (3.9.3) med 3,6 µg/ml, indtil der er opnået konstante tophøjder og retentionstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.9.3) injiceres flere gange, og højden af toppene (arealerne) for hver koncentration måles. Der plottes en kalibreringskurve ved brug af kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.4.3. Prøveopløsning

Prøveekstraktet (5.3.2) injiceres flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (arealet) af robenidintoppene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra middeltophøjden (arealet) af prøveopløsningens robenidintoppe bestemmes prøveopløsningens koncentration i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (5.4.2).

Prøvens indhold af robenidin w (mg/kg) beregnes efter ved følgende formel:

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

hvor:

c = prøveopløsningens robenidinkoncentration i µg/ml

m = prøveportionens masse i gram.

7. Evaluering af resultaterne

7.1. Identitet

Stoffets identitet kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvorved prøveekstraktets og kalibreringsopløsningens (3.9.3) spektre indeholdende 6 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

Et prøveekstrakt adderes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (3.9.3). Den tilsatte mængde robenidin skal være af samme størrelse som den skønnede mængde robenidin, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af robenidintoppen må øges, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal, ved den halve højde, ligge inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde.

7.1.2. Diodearraydetektion

Resultaterne evalueres efter nedenstående kriterier:

- Den maksimale absorptionsbølgelængde af prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margen, der afhænger af detektorsystemets opløsningsevne. Ved diodearraydetektion er den typisk ± 2 nm.
- Mellem 250 og 400 nm må prøvens og standardtoppens spektre målt i toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige for de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem de to spektre på intet observeret punkt overstiger 15 % af standardstoffets absorptions.
- Mellem 250 og 400 nm må spektrene intet sted på prøveekstraktets top være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorptions. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem spektrene på intet observeret punkt overstiger 15 % af spektrets absorptions i spidsen.

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

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser foretaget på samme prøve må ikke overstige 10 % af det højeste resultat for robenidinindhold på over 15 mg/kg.

7.3. Genfindelse

Genfindelsen for den tilsatte blindprøve bør være mindst 85 %.

8. Resultaterne af en ringanalyse

Der blev af EF arrangeret en ringanalyse, hvorved fire prøver af fjerkræ- og kaninfoder i form af mel eller piller blev analyseret af tolv laboratorier. Der blev foretaget en dobbeltanalyse af hver prøve. Resultaterne fremgår af følgende skema:

	Fjerkræ		Kanin	
	Mel	Piller	Mel	Piller
Middel mg/kg	27,0	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
genf. (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed.

2. BESTEMMELSE AF METHYLBENZOQUAT

7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolon

1. Formål og anvendelsesområde

Dette er en metode til bestemmelse af methylbenzoquat i foderstoffer. Den nedre bestemmelsesgrænse er 1 mg/kg.

2. Princip

Methylbenzoquat ekstraheres fra prøven med en opløsning af methansulfonsyre i methanol. Ekstraktet renses med dichlormethan, ved ionbyttingskromatografi og derefter igen med dichlormethan. Methylbenzoquatindholdet bestemmes ved omvendt-fase HPLC med en UV-detektor.

3. Reagenser

3.1. Dichlormethan

3.2. Methanol, HPLC-kvalitet

3.3. HPLC mobil fase

Blanding af methanol (3.2) og vand (HPLC-kvalitet) 75 + 25 (V + V).

Der filtreres gennem et 0,22 µm filter (4.5), og opløsningen udluftes (f.eks. ved ultralydsbehandling i ti minutter).

3.4. Methansulfonsyreopløsning, $\sigma = 2\%$

20,0 ml methansulfonsyre opløses i methanol (3.2) til 1 000 ml.

3.5. Saltsyreopløsning, $\sigma = 10\%$

100 ml saltsyre (p₂₀ ca. 1,18 g/ml) opløses i vand til 1 000 ml.

3.6. Kationbytterresin Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

Resinen forbehandles inden brug: 100 g resin opslemmes med 500 ml saltsyreopløsning (3.5) og opvarmes på en varmeplade til kogning under fortsat omrøring. Man lader opslemningen afkøle og dekanterer syren. Derefter filtreres gennem et filterpapir under vakuum. Resinen vaskes to gange med vand i portioner på 500 ml og derefter med 250 ml methanol (3.2). Resinen skylles med yderligere 250 ml methanol og tørres ved at sende luft gennem filterkagen. Den tørrede resin opbevares i en tilproppet flaske.

3.7. Standard: ren methylbenzoquat (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-quinolon)

3.7.1. Methylbenzoquatstamopløsning, 500 µg/ml

Med en nøjagtighed på 0,1 mg afvejes 50 mg standard (3.7), som opløses i methansulfonsyreopløsning (3.4) i en 100 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket og blandes.

3.7.2. Methylbenzoquatstandardopløsning, 50 µg/ml

5,0 ml af methylbenzoquatstamopløsningen (3.7.1) overføres til en 50 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til mærket med methanol (3.2) og blandes.

3.7.3. Kalibreringsopløsninger

Til en række 25 ml målekolber overføres henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml methylbenzoquat-standardopløsning (3.7.2). Der fyldes op til mærket med mobil fase (3.3) og blandes. Disse opløsninger har koncentrationer på henholdsvis 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 µg methylbenzoquat pr. ml. Disse opløsninger skal tilberedes umiddelbart før brug.

4. Apparat

4.1. Rysteapparat

4.2. Rotationsinddampner

4.3. Glassøjle (250 mm × 15 mm), forsynet med stophane og med en kapacitet på ca. 200 ml

4.4. HPLC-udstyr med en UV-detektor med variabel bølgelængde eller en diodearraydetektor

4.4.1. Væskerkromatografikolonne: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm pakning eller tilsvarende

4.5. Membranfiltre, 0,22 µm

4.6. Membranfiltre, 0,45 µm

5. Fremgangsmåde

5.1. Generelt

5.1.1. En blindprøve analyseres for at kontrollere, at der hverken er methylbenzoquat eller andre interfererende stoffer til stede.

5.1.2. Genfindelsen kontrolleres ved at analysere blindprøven, der tilsættes methylbenzoquat i en mængde svarende til analyseprøvens indhold. For at tilsætte 15 mg/kg, tilsættes 600 µl af stamopløsningen (3.7.1) til en 20 g blindprøve. Bland og vent ti minutter før der fortsættes med ekstraktion (5.2).

Fodnote: Til denne metode anvendes en blindprøve, af samme type som analyseprøven, og som ved analyse viser sig ikke at indeholde methylbenzoquat.

5.2. Ekstraktion

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes ca. 20 g af den forberedte prøve og overføres til en 250 ml konisk kolbe. Der tilsættes 100,0 ml methanolsulfonsyreopløsning (3.4) og omrystes mekanisk (4.1) i 30 minutter. Opløsningen filtreres gennem filtrerpapir, og filtratet gemmes til væske-væskefordelingen (5.3).

5.3. Væske-væskefordelingen

25,0 ml af det under (5.2) opnåede filtrat overføres til en 500 ml skilletragt indeholdende 100 ml salt-syreopløsning (3.5). Der tilsættes 100 ml dichlormethan (3.1) til tragten og omrystes i et minut. Man lader de to lag få tid til at skilles og aftapper det nederste (dichlormethan) lag i en 500 ml rundbundet kolbe. Ekstraktionen af vandfasen gentages med yderligere to portioner dichlormethan på hver 40 ml, og disse kombineres med det første ekstrakt i den rundbundede kolbe. Dichlormethanekstraktet inddampes til tørhed på rotationsinddampneren (4.2) ved 40 °C under reduceret tryk. Remanensen opløses i 20-25 ml methanol (3.2), hvorefter kolben tilproppes, og hele ekstraktet gemmes til ionbytningskromatografi (5.4).

5.4. Ionbytningskromatografi

5.4.1. Forberedelse af kationsbyttersøjlen

En prop af glasuld anbringes i den nederste ende af en glassøjle (4.3). Der tilberedes en opslemning på 5,0 g af den behandlede kationbytterresin (3.6) med 50 ml saltsyre (3.5), som hældes i glassøjlen, hvorefter man lader den få tid til at sætte sig. Man lader den overskydende syre løbe ud, indtil den står lige over resinoverfladen, og søjlen vaskes med vand, indtil vaskevandet er neutralt over for lakmuspapir. Der overføres 50 ml methanol (3.2) til søjlen, som man lader sive ned til resinoverfladen.

5.4.2. Søjlekromatografi

Det under (5.3) opnåede ekstrakt overføres med en pipette forsigtigt til søjlen. Den rundbundede kolbe skylles med to portioner på 5-10 ml methanol (3.2), og dette overføres til søjlen. Man lader ekstraktet løbe ned til resinoverfladen, og søjlen vaskes med 50 ml methanol, idet man sikrer sig at gennemstrømningshastigheden ikke overstiger 5 ml pr. minut. Den eluerede methanol bortkastes. Methylbenzoquat elueres fra søjlen under anvendelse af 150 ml methansulfonsyreopløsning (3.4), og eluatet fra søjlen opsamles i en 250 ml konisk kolbe.

5.5. *Væske-væskfordeling*

Det under (5.4.2) opnåede eluat overføres til en 1 liter skilletragt. Den koniske kolbe skylles med 5-10 ml methanol (3.2), og skyllevæskerne kombineres med indholdet i skilletragten. Der tilsættes 300 ml saltsyreopløsning (3.5) og 130 ml dichlormethan (3.1) og omrystes i et minut. Man lader de to faser få tid til at skilles og aftapper det nederste (dichlormethan) lag i en 500 ml rundbundet kolbe. Ekstraktionen af vandfasen gentages med yderligere to portioner dichlormethan på hver 70 ml, og disse kombineres med det første ekstrakt i den rundbundede kolbe.

Dichlormethanekstraktet inddampes til tørhed på rotationsinddamperen (4.2) ved 40 °C under reduceret tryk. Remanensen opløses i kolben med ca. 5 ml methanol (3.2), og denne opløsning overføres kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Den rundbundede kolbe skylles med yderligere to portioner 1-2 ml methanol, som overføres til målekolben. Der fyldes op til mærket med methanol og blandes. En alikvot mængde filtreres gennem et membranfilter (4.6). Denne opløsning gemmes til HPLC-bestemmelsen (5.6).

5.6. *HPLC-bestemmelse*

5.6.1. Parametre

Følgende betingelser er vejledende. Andre betingelser kan bruges, såfremt de giver de samme resultater.

HPLC-kolonne (4.4.1)

HPCL mobil fase : Blanding af methanol og vand (3.3)

Flowhastighed : 1-1,5 ml/min.

Detektorbølglængde : 265 nm

Indjektionsvolumen 20-50 µl.

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres ved, at der flere gange injiceres kalibreringsopløsning (3.7.3) med 4 µg/ml, indtil der er opnået konstante tophøjder eller arealer og retentionstider.

5.6.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.7.3) injiceres flere gange, og højden af toppene (arealerne) for hver koncentration måles. Der plottes en kalibreringskurve ved brug af kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinator og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisser.

5.6.3. Prøveopløsning

Prøveekstraktet (5.5) injiceres flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (arealet) af methylbenzoquatoppe bestemmes.

6. *Beregning af resultaterne*

Ud fra middeltophøjden (arealet) af prøveopløsningens methylbenzoquatoppe bestemmes prøveopløsningens koncentration i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (5.6.2).

Prøvens indhold af methylbenzoquat w (mg/kg) beregnes efter følgende formel :

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

hvor :

c = prøveopløsningens methylbenzoquatkoncentration i µg/ml

m = prøveportionens masse i gram.

7. *Evaluerings af resultaterne*

7.1. *Identitet*

Stoffets identitet kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvorved spektrerne af prøveekstraktet og kalibreringsopløsningen (3.7.3) indeholdende 10 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

Et prøveekstrakt adderes ved tilsætning af en passende mængde mellemstandardopløsning (3.7.2). Den tilsatte mængde methylbenzoquat skal være af samme størrelse som den skønnede mængde methylbenzoquat i prøveekstraktet.

Kun højden af methylbenzoquattoppen må øges, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal, ved den halve højde, ligge inden for $\pm 10\%$ af den oprindelige bredde.

7.1.2. Diodearraydetektion

Resultaterne evalueres efter nedenstående kriterier:

- Den maksimale absorptionsbølgelængde af prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margin, der afhænger af detektorsystemets opløsningsevne. Ved diodearraydetektion er den typisk ± 2 nm.
- Mellem 220 og 350 nm må prøvens og standardtoppens spektre målt i toppens spids på kromatogrammet ikke være forskellige for de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorptionsbans. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem to spektre på intet observeret punkt overstiger 15 % af standardstoffets absorptionsbans.
- Mellem 220 og 350 nm må spektrene intet sted på prøveekstraktets top være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorptionsbans. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem spektrene på intet observeret punkt overstiger 15 % af spektrets absorptionsbans i spidsen.

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

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser foretaget på samme prøve må ikke overstige 10 % af det højeste resultat for methylbenzoquatindhold på mellem 4 og 20 mg/kg.

7.3. Genfindelse

Genfindelsen for den tilsatte mængde i blindprøven bør være mindst 90 %.

8. Resultaterne af en ringanalyse

Fem prøver blev analyseret af ti laboratorier. Der blev foretaget en dobbeltanalyse af hver prøve.

Resultater

	Blind	Mel 1	Piller 1	Mel 2	Piller 2
Middel (mg/kg)					
Fundet niveau	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
genf. (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

S_r = standardafvigelse for repeterbarhed

CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed.