

ΟΔΗΓΙΑ 1999/27/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 20ής Απριλίου 1999

σχετικά με την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων ανάλυσης για τον προσδιορισμό του αμπρόλιου, του diclazuril και του carbadox σε ζωοτροφές και την τροποποίηση των οδηγιών 71/250/ΕΟΚ, 73/46/ΕΟΚ και την κατάργηση της οδηγίας 74/203/ΕΟΚ

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, την οδηγία 70/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 20ής Ιουλίου 1970, περί εισαγωγής τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων κοινοτικής αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την πράξη προσχώρησης της Αυστρίας, της Φινλανδίας και της Σουηδίας, και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

- (1) ότι η οδηγία 70/373/ΕΟΚ ορίζει ότι οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών που έχουν σκοπό να διαπιστώσουν την τήρηση των όρων που αναφέρονται στις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που αφορούν την ποιότητα και τη σύνθεσή τους πρέπει να γίνονται σύμφωνα με κοινοτικούς τρόπους λήψεως δειγμάτων και μεθόδους αναλύσεως·
- (2) ότι η οδηγία 70/524/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 23ης Νοεμβρίου 1970, περί των προσθέτων υλών στη διατροφή των ζώων⁽²⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 45/1999 της Επιτροπής⁽³⁾, ορίζει ότι εφόσον σε προμείγματα και ζωοτροφές έχει προστεθεί αμπρόλιο και diclazuril, στην επισήμανση πρέπει να αναφέρεται η περιεκτικότητά τους· ότι με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2788/98 της Επιτροπής, της 22ας Δεκεμβρίου 1998, περί τροποποιήσεως της οδηγίας 70/524/ΕΟΚ του Συμβουλίου όσον αφορά τις πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές, αναφορικά με την ανάκληση της άδειας χρησιμοποίησης ορισμένων αυξητικών παραγόντων⁽⁴⁾, ανεκλήθη η άδεια χρήσης του carbadox ως πρόσθετης ύλης στις ζωοτροφές, και είναι αναγκαίος επίσημος έλεγχος για ενδεχόμενη παράνομη χρήση απαγορευμένων ουσιών·
- (3) ότι πρέπει να καθιερωθούν κοινοτικές μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο αυτών των ουσιών·
- (4) ότι η πρώτη οδηγία 71/250/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 15ης Ιουνίου 1971, περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο ζωοτροφών⁽⁵⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 98/54/ΕΚ⁽⁶⁾, καθορίζει μεθόδους ανάλυσης για, μεταξύ άλλων, τον προσδιορισμό του σιναπέλαιου και της θεοβρωμίνης· ότι, υπό το φως των εξελίξεων των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων,

οι περιγραφόμενες μέθοδοι δεν είναι πλέον έγκυρες για τον επιδιωκόμενο σκοπό τους· ότι, ως εκ τούτου, πρέπει να καταργηθούν αυτές οι μέθοδοι·

- (5) ότι η τέταρτη οδηγία 73/46/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 5ης Δεκεμβρίου 1972, περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο ζωοτροφών⁽⁷⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 98/54/ΕΚ, καθορίζει μεθόδους ανάλυσης για, μεταξύ άλλων, τον προσδιορισμό της ρετινόλης (βιταμίνη Α)· ότι, υπό το φως των εξελίξεων των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων, η περιγραφόμενη μέθοδος δεν είναι πλέον έγκυρη για τον επιδιωκόμενο σκοπό· ότι, ως εκ τούτου, πρέπει να καταργηθεί η μέθοδος για τη ρετινόλη·
- (6) ότι η πέμπτη οδηγία 74/203/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 25ης Μαρτίου 1974, περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽⁸⁾, όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 81/680/ΕΟΚ⁽⁹⁾, καθορίζει μεθόδους αναλύσεως για τον προσδιορισμό του αμύλου και προϊόντων αποικοδόμησης του αμύλου μεγάλου μοριακού βάρους στις ζωοτροφές, οι οποίες περιέχουν τεμαχίδια, πούλπα, αποξηραμένα φύλλα ή «κορυφές» τεύτλων, πούλπα πατατών, αποξηραμένη ζύμη, προϊόντα πλούσια σε ινουλίνη ή υπόλοιπα τήξης λίπους, ethopabate, dinitolmide, νικαρβαζίνης και μεναδιόνης (βιταμίνη K₃)· ότι, υπό το φως των εξελίξεων των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων, όλες οι μέθοδοι που περιγράφονται σε αυτήν την οδηγία δεν είναι πλέον έγκυρες για την επίτευξη του επιδιωκόμενου σκοπού· ότι, ως εκ τούτου, πρέπει να καταργηθεί η εν λόγω οδηγία·
- (7) ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για τις ζωοτροφές,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη προβλέπουν ώστε οι αναλύσεις για τον επίσημο έλεγχο της περιεκτικότητας των ζωοτροφών και των προμειγμάτων σε αμπρόλιο, diclazuril και carbadox να πραγματοποιούνται με τις μεθόδους που καθορίζονται στο παράρτημα.

⁽¹⁾ ΕΕ L 170 της 3.8.1970, σ. 2.⁽²⁾ ΕΕ L 270 της 14.12.1970, σ. 1.⁽³⁾ ΕΕ L 6 της 12.1.1999, σ. 3.⁽⁴⁾ ΕΕ L 347 της 23.12.1998, σ. 31.⁽⁵⁾ ΕΕ L 155 της 12.7.1971, σ. 13.⁽⁶⁾ ΕΕ L 208 της 24.7.1998, σ. 49.⁽⁷⁾ ΕΕ L 83 της 30.3.1973, σ. 21.⁽⁸⁾ ΕΕ L 108 της 22.4.1974, σ. 7.⁽⁹⁾ ΕΕ L 246 της 29.8.1981, σ. 32.

Άρθρο 2

Η οδηγία 71/250/ΕΟΚ τροποποιείται ως εξής

1. Στο άρθρο 1 διαγράφονται οι λέξεις «σιναπελαίου» και «θρεοθρωμίνης».
2. Διαγράφονται τα σημεία 8 και 13 του παραρτήματος.

Άρθρο 3

Η οδηγία 73/46/ΕΟΚ τροποποιείται ως εξής:

1. Το άρθρο 2 διαγράφεται.
2. Το παράρτημα II διαγράφεται.

Άρθρο 4

Η πέμπτη οδηγία 74/203/ΕΟΚ καταργείται.

Άρθρο 5

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ, το αργότερο μέχρι την 31η Οκτωβρίου 1999, τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι αναγκαίες για τη συμμόρφωσή τους με την παρούσα οδηγία. Ενημερώνουν αμέσως σχετικά την Επιτροπή.

Τα κράτη μέλη εφαρμόζουν τα μέτρα αυτά από την 1η Νοεμβρίου 1999.

Όταν οι εν λόγω διατάξεις θεσπίζονται από τα κράτη μέλη, περιέχουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από σχετική παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομέρειες της παραπομπής αυτής καθορίζονται από τα κράτη μέλη.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 5

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 20 Απριλίου 1999.

Για την Επιτροπή

Franz FISCHLER

Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΕΡΟΣ Α

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΡΟΛΙΟΥ

Υδροχλωρικό άλας του χλωριούχου 1-[(4-αμινο-2-προπυλοπυριμιδιν-5-υλο)μεθυλο]-2-μεθυλο-πυριδινίου

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του αμπρολίου σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 25 mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα μεθανόλης-νερού. Έπειτα από αραίωση με την κινητή φάση και διήθηση μέσω φίλτρου μεμβράνης, το περιεχόμενο αμπρόλιο προσδιορίζεται με κατιονανταλλακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρήση ανιχνευτή υπερύδους.

3. Αντιδραστήρια**3.1. Μεθανόλη****3.2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC****3.3. Νερό καθαρότητας HPLC****3.4. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου, c = 0,1 mol/l**

13,80 g μονοένυδρου δισόξινου φωσφορικού νατρίου διαλύονται σε νερό (3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό (3.3) μέχρι τη χαραγή και ανακινείται.

3.5. Διάλυμα υπερχλωρικού νατρίου, c = 1,6 mol/l

224,74 g μονοένυδρου υπερχλωρικού νατρίου διαλύονται σε νερό (3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (3.3) και ανακινείται.

3.6. Κινητή φάση για την HPLC (βλέπε παρατήρηση 9.1).

Μείγμα ακετονιτρίλιου (3.2), διαλύματος δισόξινου φωσφορικού νατρίου (3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Πριν από τη χρήση, διηθείται διαμέσου διηθητικής μεμβράνης πάχους 0,22 μm (4.3) και το διάλυμα απεριώνεται [π.χ. σε λουτρό υπερήχων (4.4) για 15 λεπτά τουλάχιστον].

3.7. Πρότυπη ουσία: καθαρό αμπρόλιο, υδροχλωρικό άλας χλωριούχου 1-[(4-αμινο-2-προπυλοπυριμιδιν-5-υλο)μεθυλο]-2-μεθυλο-πυριδινίου, E 750 (βλέπε σημείο 9.2)**3.7.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 500 μg/ml**

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg αμπρολίου (3.7), διαλύονται σε 80 ml μεθανόλης (3.1) και η φιάλη τοποθετείται για 10 min σε λουτρό υπερήχων (4.4). Στη συνέχεια, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και ανακινείται. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.7.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 50 μg/ml

5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) παραλαμβάνονται με σιφόνιο και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διαλύτη εκχυλίσεως (3.8) και ανακινείται. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.7.3. Διαλύματα βαθμονόμησης

0,5, 1,0 και 2,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.7.2) μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.6) και ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,5, 1,0 και 2,0 μg αμπρολίου ανά ml αντιστοίχως. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να ετοιμάζονται λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν.

- 3.8. Διαλύτης εκχυλίσεως
Μείγμα μεθανόλης (3.1)-νερού 2+1 (v+v)
4. **Συσκευές**
- 4.1. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα εγχύσεως, κατάλληλο για έγχυση όγκων 100 µl
- 4.1.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας 125 mm × 4 mm, κατιοανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 10 µm, ή ισοδύναμη
- 4.1.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων
- 4.2. Φίλτρο μεμβράνης, υλικό PTFE, 0,45 µm
- 4.3. Φίλτρο μεμβράνης, 0,22 µm
- 4.4. Λουτρό υπερήχων
- 4.5. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας
5. **Διαδικασία**
- 5.1. *Γενικά*
- 5.1.1. Τυφλό
- Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2), θα πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε αμπρόλιο ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα θα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν θα πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό αμπρόλιο ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.
- 5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης
- Θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας αμπρολίου, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθεται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχυλίσεως (5.2).
- Εναλλακτικώς, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε σημείο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα αμπρολίου παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.
- 5.2. *Εκχύλιση*
- 5.2.1. Προμείγματα (περιεκτικότητα < 1 % σε αμπρόλιο) και ζωοτροφές
- Σε κωνική φιάλη των 500 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g, 5-40 g του δείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχυλίσεως (3.8). Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται στο μαγνητικό αναδευτήρα (4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 µg/ml και αναμειγνύεται (βλέπε σημείο 9.3). 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται διαμέσου μεμβράνης (4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).
- 5.2.2. Προμείγματα (περιεκτικότητα ≥ 1 % σε αμπρόλιο)
- Σε κωνική φιάλη των 500 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, 1-4 g του προμείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχυλίσεως (3.8). Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται στο μαγνητικό αναδευτήρα (4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 µg/ml και αναμειγνύεται. 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται διαμέσου μεμβράνης (4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).
- 5.3. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.1.1):	125 mm × 4 mm, κατιοανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 10 μm, πλήρωσης, ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.6):	Μείγμα ακετονιτριλίου (3.2), διαλύματος δισόξινουφωσφορικού νατρίου (3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (3.5), 450+450+100 (V+V+V)
Ταχύτητα ροής:	0,7-1 ml/min
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	264 nm
Εκχυόμενος όγκος:	100 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας μερικές φορές το διάλυμα βαθμονόμησης (3.7.3) που περιέχει 1,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς,

Κάθε διάλυμα βαθμονόμησης (3.7.3) εγχύεται μερικές φορές και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής κάθε συγκέντρωσης. Χaráσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τεταγμένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος,

Εγχύεται μερικές φορές το εκχύλισμα του δείγματος (5.2) χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων βαθμονόμησης και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml βάσει της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).

Η συγκέντρωση w σε mg/kg του αμπρολίου στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

V = όγκος του διαλύτη εκχύλισης (3.8) σε ml σύμφωνα με το 5.2 (δηλαδή 200 ml),

$\bar{\theta}$ = συγκέντρωση αμπρολίου στο εκχύλισμα δείγματος (5.2) σε μg/ml,

f = συντελεστής αραιώσεως σύμφωνα με το 5.2,

m = μάζα του δείγματος δοκιμής σε g.

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων

7.1. Ταυτότητα

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή δίδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (5.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (3.7.3) που περιέχει 2,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (5.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (3.7.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου αμπρολίου θα πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του αμπρολίου που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραιώση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του αμπρολίου θα πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, πρέπει να είναι $\pm 10\%$ του αρχικού πλάτους της κορυφής του αμπρολίου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι ίδια στα πλαίσια των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη διόδων είναι συνήθως ± 2 nm.
- β) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.
- γ) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει

- το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο από 25 mg/kg έως 500 mg/kg,
- τα 75 mg/kg για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο μεταξύ 500 mg/kg και 1 000 mg/kg,
- το 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο άνω των 1 000 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν τρεις πτηνοτροφές (δείγμα 1-3), μια ανόργανη (δείγμα 4) και ένα πρόμειγμα (δείγμα 5). Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 (τυφλό)	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
M.O. [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
ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: αριθμός εργαστηρίων,

n: αριθμός μεμονωμένων τιμών,

s_r : τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας,

CV_r : συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας,

s_R : τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας,

CV_R : συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

9. Παρατηρήσεις

- 9.1. Εάν το δείγμα περιέχει θειαμίνη, η κορυφή της θειαμίνης στο χρωματογράφημα εμφανίζεται λίγο πριν από την κορυφή του αμπρολίου. Σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο, το αμπρόλιο και η θειαμίνη πρέπει να διαχωρίζονται. Εάν το αμπρόλιο και η θειαμίνη δεν διαχωρίζονται από τη στήλη (4.1.1) που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο, ένα μέρος του ακετονιτρίλιου της κινητής φάσης (3.6) μέχρι 50 % πρέπει να αντικαθίσταται από μεθανόλη.
- 9.2. Σύμφωνα με την Βρετανική Φαρμακοποιία, το φάσμα διαλύματος αμπρολίου ($c = 0.02 \text{ mol/l}$) σε υδροχλωρικό οξύ ($c = 0.1 \text{ mol/l}$) εμφανίζει μέγιστα στα 246 nm και 262 nm. Η απορρόφηση ανέρχεται σε 0,84 στα 246 nm και 0,80 στα 262 nm.
- 9.3. Το εκχύλισμα πρέπει να αραιώνεται πάντοτε με την κινητή φάση διότι διαφορετικά ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής του αμπρολίου μπορεί να μετατοπιστεί σημαντικά λόγω μεταβολών της ιονικής ισχύος.

ΜΕΡΟΣ Β**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DICLAZURIL**

(+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5-τετραϋδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2-υλο) φαινυλ]ακετονιτρίλιο.

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αποσκοπεί στον προσδιορισμό του diclazuril σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 0,1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 0,5 mg/kg.

2. Αρχή

Έπειτα από προσθήκη εσωτερικού προτύπου, το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Στις ζωοτροφές, κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος καθαρίζεται σε φυσίγγιο εκχύλισης στερεάς φάσεως C 18. Το diclazuril εκλύεται από το φυσίγγιο με μείγμα οξινισμένης μεθανόλης και νερού. Έπειτα από εξάτμιση, το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Στα προμείγματα, το εκχύλισμα εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Η περιεκτικότητα σε diclazuril προσδιορίζεται με γρήγη χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC) ανάστροφης φάσης τριών διαλυμάτων βαθμωτής έκλουσης με χρήση ανιχνευτή UV.

3. Αντιδράστρια

- 3.1. Νερό καθαρότητας HPLC
- 3.2. Οξικό αμμώνιο
- 3.3. Όξινο θειικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBHS)
- 3.4. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC
- 3.5. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC
- 3.6. N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- 3.7. Υδροχλωρικό οξύ, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8. Πρότυπη ουσία: diclazuril II-24 : (+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5-τετραϋδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2-υλο) φαινυλ] ακετονιτρίλιο εγγυημένης καθαρότητας, E771.
- 3.8.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα diclazuril, 500 $\mu\text{g/ml}$

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg πρότυπης ουσίας diclazuril (3.8). Διαλύονται σε DMF (3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

- 3.8.2. Πρότυπο διάλυμα diclazuril, 50 µg/ml
- 5,00 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.8.1.) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για 1 μήνα.
- 3.9. Ουσία εσωτερικού προτύπου: 2,6 διχλωρο-α-(4-χλωροφαινυλο)-4-(4,5 διυδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2(3H)-υλο)α-μεθυλοβενζολο-ακετονιτρίλιο
- 3.9.1. Αρχικό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 500 µg/ml
- Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg ουσίας εσωτερικού προτύπου (3.9). Διαλύονται σε DMF (3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.
- 3.9.2. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 50 µg/ml
- 5,00 ml του αρχικού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.1.) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.
- 3.9.3. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου για προμείγματα, p/1000 mg/ml (p = ονομαστική περιεκτικότητα diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg)
- Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg p/10 mg της ουσίας εσωτερικού προτύπου, διαλύονται σε DMF (3.6) σε λουτρό υπερήχων (4.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.
- 3.10. Διάλυμα βαθμονόμησης, 2 µg/ml
- 2,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.2) μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 16 ml DMF (3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν να χρησιμοποιηθεί.
- 3.11. Στήλη εκχύλισης στερεάς φάσεως C 18, π.χ. Bond Elut, μέγεθος: 1 cc, προσροφητική μάζα: 100 mg.
- 3.12. Διαλύτης εκχύλισης: οξινησμένη μεθανόλη
- 5,0 ml υδροχλωρικού όξεος (3.7) φέρονται με σιφόνιο σε 1 000 ml μεθανόλης (3.5), και αναμειγνύονται.
- 3.13. Κινητή φάση για HPLC
- Υγρό εκλούσεως Α: διάλυμα οξικού αμμωνίου-όξινου θειικού τετραβουτυλαμμωνίου
- 3.13.1. 5 g οξικού αμμωνίου (3.2) και 3,4 g TBHS (3.3) διαλύονται σε 1 000 ml νερού (3.1) και αναμειγνύονται.
- 3.13.2. Υγρό εκλούσεως Β: ακετονιτρίλιο (3.4)
- 3.13.3. Υγρό εκλούσεως Γ: μεθανόλη (3.5)
4. **Συσκευές**
- 4.1. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης.
- 4.2. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα τριών διαλυτών βαθμωτής έκλυσης.
- 4.2.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, Hypersil ODS, 3 µm, 100 mm × 4,6 mm ή ισοδύναμη.
- 4.2.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων,
- 4.3. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.
- 4.4. Φίλτρο μεμβράνης, 0,45 µm.

4.5. Πολλαπλή κενού (vacuum manifold).

4.6. Λουτρό υπερήχων.

5. Διαδικασία

5.1. Γενικά

5.1.1. Τυφλό

Θα πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε diclazuril ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα θα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν θα πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό diclazuril ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη μιας ποσότητας diclazuril, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 1 mg/kg, 0,1 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.8.1) προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχυλίσεως (5.2).

Εναλλακτικώς, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα diclazuril παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση

5.2.1. Ζωοτροφές

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g περίπου 50 g του δείγματος. Μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθενται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.2) και 200 ml διαλύτη εκχυλίσεως (3.12) και η φιάλη πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης (4.1) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά. Ποσότητα 20 ml του υπερκείμενου υγρού μεταφέρεται σε κατάλληλο γυάλινο δοχείο και αραιώνεται με 20 ml νερό. Το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε φυσιγγίο εκχυλίσεως (3.11), και διέρχεται με εφαρμογή κενού (4.5). Η στήλη (3.11) εκπλένεται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχυλίσεως (3.12) και νερού, 65 + 35 (V + V). Τα συλλεγόμενα κλάσματα απορρίπτονται και οι απομένουσες ουσίες εκλούονται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχυλίσεως (3.12) και νερού, 80 + 20 (V + V). Το κλάσμα αυτό εξατμίζεται μέχρι ξηρού σχεδόν με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα (4.3) στους 60 °C. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1,0 ml DMF (3.6), προστίθεται 1,5 ml νερό (3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί διήθηση μέσω μεμβράνης (4.4) και κατόπιν ο προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.2.2. Προμείγματα

Ζυγίζεται με ακρίβεια 0,001 g περίπου 1 g του δείγματος. Μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθεται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.3), 200 ml διαλύτη εκχυλίσεως (3.12) και η φιάλη πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται όλη τη νύκτα στο τάρακτρο (4.1). Αφήνεται να κατακαθίσει για 10 λεπτά. Ποσότητα 10 000/ρ ml (ρ = ονομαστική περιεκτικότητα του diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg) του υπερκείμενου υγρού μεταφέρεται σε φιάλη στρογγυλού πυθμένα με κατάλληλο μέγεθος. Το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση στους 60 °C με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (4.3). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 10,0 ml DMF (3.6), προστίθενται 15,0 ml νερό (3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.3. Προσδιορισμός με HPLC

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

— Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.2.1.):

100 mm × 4,6 mm, R-P18, 3 μm, ή ισοδύναμη

— Κινητή φάση:

Υγρό εκλούσεως Α (3.13.1): υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και όξινου θειικού τετραουτυλαμμωνίου

Υγρό εκλούσεως Β (3.13.2): ακετονιτρίλιο

Υγρό εκλούσεως Γ (3.13.3): μεθανόλη

- Τρόπος έκλουσης: — γραμμική βαθμωτή έκλουση
 — αρχικές συνθήκες: $A+B+\Gamma = 60+20+20 (V+V+V)$
 — έπειτα από 10 min βαθμωτή έκλουση επί 30 min έως ότου:
 $A+B+\Gamma = 45+20+35 (V+V+V)$.
 Καθαρισμός με B επί 10 min.
- Ταχύτητα ροής: 1,5–2 ml/min
 — Εγχύμενος όγκος: 20 μl
 — Μήκος κύματος ανιχνευτή: 280 ml

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας μερικές φορές το διάλυμα βαθμονόμησης (3.10) που περιέχει 2 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Διάλυμα βαθμονόμησης

Εγχύονται μερικές φορές 20 μl του διαλύματος βαθμονόμησης (3.10) και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχύονται μερικές φορές 20 μl του διαλύματος δείγματος (5.2.1 ή 5.2.2) και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

6.1. Ζωοτροφές

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril w (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

$h_{d,s}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (5.2.1),

$h_{i,s}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (5.2.1),

$h_{d,c}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10),

$h_{i,c}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10),

$\theta_{d,c}$ = συγκέντρωση του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης σε μg/ml (3.10),

m = μάζα του προς δοκιμή δείγματος σε g,

V = όγκος του εκχυλίσματος δείγματος σύμφωνα με το 5.2.1 (δηλαδή 2,5 ml).

6.2. Προμείγματα:

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril w (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

$h_{d,c}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10),

$h_{i,c}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10),

$h_{d,s}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (5.2.2),

$h_{i,s}$ = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (5.2.2),

$\theta_{d,c}$ = συγκέντρωση του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10)

m = μάζα του προς δοκιμή δείγματος σε g,

V = όγκος του εκχυλίσματος δείγματος σύμφωνα με το 5.2.2 (δηλαδή 25 ml),

p = ονομαστική συγκέντρωση του diclazuril σε mg/kg στο πρόμειγμα.

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (5.2.1 ή 5.2.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (3.10).

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (5.2.1 ή 5.2.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (3.10). Η ποσότητα του προστιθέμενου diclazuril θα πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του diclazuril που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του diclazuril και της κορυφής του εσωτερικού προτύπου θα πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, πρέπει να είναι $\pm 10\%$ του αρχικού πλάτους της κορυφής του diclazuril ή της κορυφής του εσωτερικού προτύπου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος δείγματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι ίδια στα πλαίσια των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ισχύ του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη διόδων είναι συνήθως ± 2 nm.

β) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 30 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril από 0,5 mg/kg έως 2,5 mg/kg

— τα 0,75 mg/kg για περιεκτικότητες σε diclazuril μεταξύ 2,5 mg/kg και 5 mg/kg

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril άνω των 5 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 5 δείγματα από 11 εργαστήρια. Τα δείγματα αυτά συνίσταντο από δύο προμείγματα: το ένα αναμείχθηκε με οργανικό υλικό (O 100) και το άλλο με ανόργανο υλικό (A 100). Η θεωρητική περιεκτικότητα είναι 100 mg diclazuril ανά kg. Οι τρεις μεικτές πτηνοτροφές παρασκευάστηκαν από τρεις διαφορετικούς παραγωγούς (NL) (L1/Z1/K1). Η θεωρητική περιεκτικότητα είναι 1 mg diclazuril ανά kg. Οι οδηγίες προς τα εργαστήρια ήταν να αναλύσουν κάθε δείγμα μια φορά ή εις διπλούν. (Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά μ' αυτή τη διεργαστηριακή μελέτη βλέπε Journal of AOAC International, τόμος 77, αριθ. 6 1994, σ. 1359-1361). Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 A 100	Δείγμα 2 O 100	Δείγμα 3 L 1	Δείγμα 4 Z 1	Δείγμα 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
M.O.	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
Ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: αριθμός εργαστηρίων,

n: αριθμός μεμονωμένων τιμών,

s_r: τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας,

CV_r: συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας,

S_R: τυπική απόκλιση αναπαραγωγικότητας,

CV_R: συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγικότητας.

9. Παρατηρήσεις

Η απόκριση του diclazuil πρέπει να έχει καταδειχθεί προηγουμένως ότι είναι γραμμική στην περιοχή των μετρούμενων συγκεντρώσεων.

ΜΕΡΟΣ Γ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ CARBADOX

Μέθωλο 3-(2-κιννοξαλινυλομεθυλενο)καρβαζικό Ν^l, Ν^h-διοξείδιο

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του carbadox σε ζωοτροφές, προμείγματα και παρασκευάσματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 10 mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα αναμιγνύεται με νερό και εκχυλίζεται με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο. Στις ζωοτροφές, κατάλληλη ποσότητα του διηθημένου εκχυλίσματος υποβάλλεται σε καθαρισμό σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Στα προμείγματα και παρασκευάσματα, ποσότητα του διηθημένου εκχυλίσματος αραιώνεται σε κατάλληλη συγκέντρωση με νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. Η περιεκτικότητα του carbadox προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσης με χρήση ανιχνευτή UV.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Μεθανόλη

3.2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC

3.3. Οξικό οξύ, w = 100 %

3.4. Οξείδιο αργιλίου: ουδέτερο, βαθμός δραστηριότητας I

3.5. Μεθανόλη-ακετονιτρίλιο 1 + 1 (V + V)

500 ml μεθανόλης (3.1) αναμιγνύεται με 500 ml ακετονιτρίλιου (3.2).

3.6. Οξικό οξύ, σ = 10 %

10 ml οξικού οξέος (3.3) αραιώνονται μέχρι τα 100 ml με νερό.

3.7. Οξικό νάτριο, CH₃COONa

- 3.8. Νερό καθαρότητας HPLC
- 3.9. Οξικό ρυθμιστικό διάλυμα, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
 0,82 g οξικού νατρίου (3.7) διαλύονται σε 700 ml νερό (3.8) και ρυθμίζεται το pH στο 6,0 με οξικό οξύ (3.6). Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (3.8) και αναμειγνύεται.
- 3.10. Κινητή φάση για HPLC
 825 ml οξικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.9) αναμειγνύονται με 175 ml ακετονιτρίλιου (3.2). Ακολουθεί διήθηση μέσω φίλτρου 0,22 μm (4.5) και απαερίωση του διαλύματος (π.χ. με υπερήχους για 10 λεπτά).
- 3.11. Πρότυπη ουσία
 Καθαρό carbadox: Μέθυλο 3-(2-κινόξαλινομεθυλενο)καρβαζικό Ν¹,Ν⁴-διοξείδιο, E 850
- 3.11.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα carbadox, 100 $\mu\text{g/ml}$ (βλέπε σημείο 5. Διαδικασία)
 Σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg πρότυπης ουσίας carbadox (3.11). Διαλύονται σε μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) με εφαρμογή υπερήχων (4.7). Μετά τους υπερήχους, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία $\pm 4^\circ\text{C}$.
- 3.11.2. Διαλύματα βαθμονόμησης
 2,0, 5,0, 10,0, και 20,0 ml του αρχικού προτύπου διαλύματος (3.11.1) μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 100 ml. Προστίθενται 30 ml νερό, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 2,0, 5,0, 10,0 και 20,0 $\mu\text{g/ml}$ carbadox αντίστοιχα. Τα διαλύματα βαθμονόμησης πρέπει να ετοιμάζονται λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν.
Σημείωση: Για τον προσδιορισμό carbadox σε ζωοτροφές που περιέχουν λιγότερο από 10 mg/kg, πρέπει να παρασκευάζονται διαλύματα βαθμονόμησης με συγκέντρωση κάτω 2,0 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Μείγμα νερού-[μεθανόλης-ακετονιτρίλιου] (3.5), 300 + 700 (V + V)
 300 ml νερό αναμειγνύονται με 700 ml του μείγματος μεθανόλης-ακετονιτρίλιου (3.5).
4. **Συσκευές**
- 4.1. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας
- 4.2. Ηθμός υαλοσινών (Whatman GF/A ή ισοδύναμος)
- 4.3. Γυάλινη στήλη (μήκος 300 έως 400 mm, εσωτερική διάμετρος περίπου 10 mm) με εσωρισμένη απόληξη σύνδεσης και θαλβίδα εξαγωγής.
Σημείωση: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και γυάλινη στήλη εφοδιασμένη με στρόφιγγα ή γυάλινη στήλη που στενεύει στο άκρο της. Στην περίπτωση αυτή, στο κάτω άκρο εισάγεται μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα και πιέζεται προς τα κάτω με μια γυάλινη ράβδο.
- 4.4. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα εγχύσεως, κατάλληλο για έγχυση όγκων 20 μl
- 4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας: 300 mm \times 4 mm, C18, 10 μm ή ισοδύναμη
- 4.4.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων κατάλληλος για περιοχή μηκών κύματος 225 έως 400 nm
- 4.5. Φίλτρο μεμβράνης, 0,22 μm
- 4.6. Φίλτρο μεμβράνης, 0,45 μm
- 4.7. Λουτρό υπερήχων
5. **Διαδικασία**
- Σημείωση:* Το carbadox είναι ευαίσθητο στο φως. Όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται σε ημίφως ή να χρησιμοποιούνται υάλινα σκεύη σκουρόχρωμα ή τυλιγμένα με φύλλο αλουμινίου.
- 5.1. *Γενικά*

5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2), θα πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε carbadox ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα θα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν θα πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό carbadox ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα (5.1.1) εμπλουτισμένο με προσθήκη μιας ποσότητας carbadox, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό 50 mg/kg, 5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.11.1) μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 200 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 10 g του τυφλού, αναμειγνύονται και περιμένουμε για 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Εναλλακτικώς, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε σημείο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα carbadox παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση

5.2.1. Ζωοτροφές

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g, περίπου 10 g του δείγματος και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 200 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 35,0 ml μεθανόλης-ακετονιτριλίου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται για 30 λεπτά σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή αναδεύεται με το μαγνητικό αναδευτήρα. Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2). Το εν λόγω διάλυμα κρατιέται για το στάδιο καθαρισμού (5.3).

5.2.2. Προμείγματα (0,1-2,0 %)

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, περίπου 1 g του μη αλεσμένου δείγματος και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 200 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 35,0 ml μεθανόλης-ακετονιτριλίου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται για 30 λεπτά σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή αναδεύεται με το μαγνητικό αναδευτήρα (4.1). Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2). Κατάλληλη ποσότητα διηθήματος μεταφέρεται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτριλίο (3.5) και αναμειγνύονται. Η συγκέντρωση του carbadox στο τελικό διάλυμα θα πρέπει να είναι περίπου 10 µg/ml. Κατάλληλη ποσότητα διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 µm (4.6). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.2.3. Παρασκευάσματα (> 2 %),

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, περίπου 0,2 g του μη αλεσμένου δείγματος και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Προστίθενται 45,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 105,0 ml μεθανόλης-ακετονιτριλίου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και το περιεχόμενο ομοιογενοποιείται. Το δείγμα υποβάλλεται για 15 λεπτά σε επεξεργασία με υπερήχους (4.7) και ακολουθεί ανακίνηση ή ανάδευση για 15 λεπτά (4.1). Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2). Κατάλληλη ποσότητα του διηθήματος αραιώνεται με μείγμα νερού-μεθανόλης ακετονιτριλίου (3.12) μέχρι τελικής συγκεντρώσεως carbadox 10-15 µg/ml (για παρασκεύασμα 10 %, ο συντελεστής αραιώσεως είναι 10). Κατάλληλη ποσότητα διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 µm filter (4.6). Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.3. Καθαρισμός

5.3.1. Ετοιμασία της στήλης οξειδίου του αργιλίου

Ζυγίζονται 4 g οξειδίου του αργιλίου (3.4) και μεταφέρονται στη γυάλινη στήλη (4.3).

5.3.2. Καθαρισμός δείγματος

15 ml του διηθημένου εκχυλίσματος (5.2.1) μεταγγίζονται στη στήλη του οξειδίου του αργιλίου και τα πρώτα 2 ml του εκλούσματος απορρίπτονται. Τα επόμενα 5 ml συλλέγονται και κατάλληλη ποσότητα διηθείται διαμέσου φίλτρου 0,45 µm (4.6). Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.4. Προσδιορισμός με HPLC

5.4.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα:

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.1.1):	300 mm × 4 mm, C18, 10 μm, ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.10):	Μείγμα οξικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.9) και ακετονιτριλίου (3.2), 825+175 (V + V)
Ταχύτητα ροής	1,5-2 ml/min
Μήκος κύματος ανιχνεύσεως	365 nm
Εγχύμενος όγκος:	20 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας μερικές φορές το διάλυμα βαθμονόμησης (3.11.2) που περιέχει 5,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα βαθμονόμησης (3.11.2) εγχύεται μερικές φορές και μετρώνται τα ύψη (εμβαδά) των κορυφών για κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τετημημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχύεται μερικές φορές το εκχύλισμα δείγματος [(5.3.2) για ζωοτροφές, (5.2.2) για προμείγματα και (5.2.3) για παρασκευάσματα] και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του carbadox.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του carbadox του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml βάσει της καμπύλης αναφοράς (5.4.2).

6.1. Ζωοτροφές

Η περιεκτικότητα w (mg/kg) του carbadox στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

δ = συγκέντρωση του carbadox στο εκχύλισμα δείγματος (5.3.2.) σε μg/ml,

V_1 = όγκος εκχυλίσεως ml (δηλαδή 50),

m = μάζα της προς δοκιμή ποσότητας σε g.

6.2. Προμείγματα και παρασκευάσματα

Η περιεκτικότητα w (mg/kg) του carbadox στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

δ = συγκέντρωση του carbadox στο εκχύλισμα δείγματος (5.2.2. ή 5.2.3.) σε μg/ml,

V_2 = όγκος εκχυλίσεως σε ml δηλαδή για προμείγματα, 150 για παρασκευάσματα),

f = συντελεστής αραιώσεως σύμφωνα με το 5.2.2 (προμείγματα) ή 5.2.3. (παρασκευάσματα),

m = μάζα της προς δοκιμή ποσότητας σε g.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης για προμείγματα και παρασκευάσματα

	Προμείγματα				Παρασκευάσματα		
	A	B	Γ	Δ	A	B	Γ
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
M.O. [mg/kg]	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _i [mg/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 [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
Ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: αριθμός εργαστηρίων,

n: αριθμός μεμονωμένων τιμών,

s_i: τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας,CV_i: συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας,S_R: τυπική απόκλιση αναπαραγωγικότητας,CV_R: συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγικότητας.