

31999L0027

L 118/36

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

6.5.1999

DYREKTYWA KOMISJI 1999/27/WE

z dnia 20 kwietnia 1999 r.

ustanawiająca wspólnotowe metody analiz dla oznaczania amprolium, diklaurilu i karbadoksu w paszach oraz zmieniająca dyrektywy 71/250/EWG, 73/46/EWG i uchylająca dyrektywę 74/203/EWG

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz⁽¹⁾, ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia Austrii, Finlandii i Szwecji, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dyrektywa 70/373/EWG przewiduje, że urzędowe kontrole pasz w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych regulujących ich jakość i skład powinny być dokonywane zgodnie ze wspólnotowymi metodami pobierania próbek i analiz.
- (2) Dyrektywa Rady 70/524/EWG z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych⁽²⁾, ostatnio zmieniona rozporządzeniem Komisji 45/1999⁽³⁾, przewiduje, że zawartość amprolium i diklaurilu musi być wskazana na etykietowaniu, jeśli substancje te dodawane są do premiksów i pasz; zezwolenie na stosowanie karbadoksu jako dodatku paszowego zostało wycofane rozporządzeniem Komisji 2788/98 z dnia 22 grudnia 1998 r. zmieniającym dyrektywę Rady 70/524/EWG dotyczącą dodatków paszowych odnośnie do cofnięcia zezwolenia dla niektórych stymulatorów wzrostu⁽⁴⁾ i niezbędna jest urzędowa kontrola możliwego nielegalnego stosowania zakazanych substancji.
- (3) Należy ustalić wspólnotowe metody analiz dla kontroli tych substancji.
- (4) Pierwsza dyrektywa Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz⁽⁵⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą 98/54/WE⁽⁶⁾, określa metody analiz dotyczące między innymi oznaczania oleju

gorczykowego i teobrominy; w świetle postępu naukowo-technicznego opisane metody tracą ważność; właściwe jest usunięcie tych metod.

- (5) Czwarta dyrektywa Komisji 73/46/EWG z dnia 5 grudnia 1972 r. ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz⁽⁷⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą 98/54/WE, określa metody dotyczące między innymi oznaczania retinolu (witaminy A); w świetle postępu naukowo-technicznego opisana metoda traci ważność; właściwe jest usunięcie tej metody.
- (6) Piąta dyrektywa Komisji 74/203/EWG z dnia 25 marca 1974 r. ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz⁽⁸⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą 81/680/EWG⁽⁹⁾, określa metody analiz dotyczące oznaczania skrobi i produktów rozkładu skrobi o dużej masie cząsteczkowej w paszach zawierających krawankę buraczaną, pulpę buraczaną, suche liście buraczane lub główki, pulpę ziemniaczaną, suche drożdże, produkty bogate w inulinę lub skwarki, amprolium, etopabat, dinitolmid, nikarbazin i menadion (witaminę K3); w świetle postępu naukowo-technicznego opisane metody tracą ważność; właściwe jest usunięcie tych metod.
- (7) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ;

Artykuł 1

Państwa Członkowskie zapewniają, aby analizy prowadzone w celu urzędowych kontroli zawartości amprolium, diklaurilu i karbadoksu w paszach i premiksach przeprowadzane były z wykorzystaniem metod wymienionych w niniejszym Załączniku.

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

Artykuł 2

W dyrektywie 71/250/EWG wprowadza się następujące zmiany:

- 1) W art. 1 skreśla się wyrażenia „olej gorczycowy” i „teobromina”.
- 2) Skreśla się pkt 8 i 13 Załącznika.

Artykuł 3

W dyrektywie 73/46/EWG wprowadza się następujące zmiany:

- 1) Skreśla się art. 2.
- 2) Skreśla się załącznik II.

Artykuł 4

Dyrektywa 74/203/EWG traci moc.

Artykuł 5

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie najpóźniej do dnia 31 października 1999 r. przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Państwa Członkowskie stosują te przepisy najpóźniej od dnia 1 listopada 1999 r.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

Artykuł 6

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 7

Niniejsza dyrektywa jest skierowana do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 20 kwietnia 1999 r.

W imieniu Komisji

Franz FISCHLER

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

Część A

OZNACZANIE AMPROLIUM

Chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidino-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny

1. Cel i zakres

Niniejsza metoda służy do oznaczania amprolium w paszach i prefiksach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, granica oznaczania wynosi 25 mg/kg.

2. Zasada

Próbka ekstrahowana jest mieszaniną metanolu i wody. Po rozpuszczeniu z fazą ruchomą i filtrowaniu przepornym oznacza się zawartość amprolium metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z wymianą kationową (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. Odczynniki

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl, czystość HPLC.

3.3. Woda, czystość HPLC.

3.4. Roztwór diwodorofosforanu sodu, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Rozpuścić 13,80 g monohydratu diwodorofosforanu sodu w wodzie (ppkt 3.3) w 1000-mililitrowej kolbie miarowej, uzupełnić wodą (ppkt 3.3) do kreski i wymieszać.

3.5. Roztwór nadchloranu sodu, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Rozpuścić 224,74 g monohydratu nadchloranu sodu w wodzie (ppkt 3.3) w 1000-mililitrowej kolbie miarowej, uzupełnić wodą (ppkt 3.3) do kreski i wymieszać.

3.6. Faza ruchoma dla HPLC (patrz uwaga 9.1).

Mieszanina acetonitrylu (ppkt 3.2), roztworu diwodorofosforanu sodu (ppkt 3.4) oraz roztworu nadchloranu sodu (ppkt 3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Przed użyciem przefiltrować przez filtr membranowy $0,22 \mu\text{m}$ (ppkt 4.3) i odgazować roztwór (np. w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.4) przez co najmniej 15 minut).

3.7. Substancja wzorcowa: czyste amprolium, chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidino-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny, E 750 (patrz ppkt 9.2).

3.7.1. Podstawowy roztwór mianowany amprolium, $500 \mu\text{g/ml}$

Odważyć, z dokładnością do $0,1 \text{ mg}$, 50 mg amprolium (ppkt 3.7) w kolbie miarowej o pojemności 100 ml . Rozpuścić w 80 ml metanolu (ppkt 3.1) i umieścić kolbę na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.4). Następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski wodą i wymieszać. W temperaturze $4 \text{ }^\circ\text{C}$ roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.7.2. Pośredni roztwór mianowany amprolium, $50 \mu\text{g/ml}$

Pipetą przenieść 5 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.7.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml , uzupełnić do znaku rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym (ppkt 3.8) i wymieszać. W temperaturze $4 \text{ }^\circ\text{C}$ roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.7.3. Roztwory wzorcowe

Przenieść $0,5$, 1 i 2 ml pośredniego roztworu mianowanego (ppkt 3.7.2) do kilku kolb miarowych o pojemności 50 ml . Uzupełnić do kreski fazą ruchomą (ppkt 3.6) i wymieszać. Roztwory te odpowiadają $0,5$, 1 i $2 \mu\text{g/ml}$ amprolium. Roztwory te muszą być sporządzane bezpośrednio przed użyciem.

3.8. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny

Mieszanka metanolu (ppkt 3.1) i wody 2 + 1 (v + v).

4. **Aparatura**

4.1. Sprzęt do HPLC z systemem wtryskowym do porcji o objętości 100 µl.

4.1.1. Kolumna kationowa jonowymienna do chromatografii cieczowej 125 mm 4 mm Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 µm, lub równoważne

4.1.2. Detektor do wykrywania promieniowania ultrafioletowego o różnej długości fali lub detektor diodowy.

4.2. Filtr membranowy, PTFE, 0,45 µm.

4.3. Filtr membranowy, 0,22 µm.

4.4. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.5. Wytrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne.

5. **Procedura**

5.1. *Informacje ogólne*

5.1.1. Ślepa próba

Do celów testu odzysku (ppkt 5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próby w celu upewnienia się, czy nie występują w niej amprolium lub substancje przeszkadzające. Rodzaj paszy do ślepej próby powinien być podobny do rodzaju próbki, a analiza powinna potwierdzić brak amprolium lub substancji przeszkadzających.

5.1.2. Test odzysku

Test odzysku powinien być przeprowadzony na drodze analizy ślepej próby, wzbogaconej pewną ilością amprolium podobną do występującej w próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 100 mg/kg dodać 10 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.7.1) do kolby stożkowej 250-mililitrowej i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut, mieszając kilkakrotnie przed przejściem do etapu ekstrakcji (ppkt 5.2).

Alternatywnie, jeżeli nie ma ślepej próby zbliżonej typem do próbki (patrz 5.1.1), test odzysku można przeprowadzić stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest uzupełniana pewną ilością amprolium podobną do zawartej w próbce. Próbka ta jest poddawana analizie wraz z próbką paszy niewzbogaconą amprolium i odzysk może być obliczony przez odejmowanie.

5.2. *Ekstrakcja*

5.2.1. Premiksy (zawartość < 1 % amprolium) i pasze

Odważyć z dokładnością do 0,01 g, 5–40 g próbki w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej 500-mililitrowej i dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i umieścić na 1 godzinę na wytrząsarce lub w mieszadle magnetycznym (ppkt 4.5). Rozcieńczyć odpowiednią część ekstraktu fazą ruchomą (ppkt 3.6) do zawartości amprolium 0,5–2 µg/ml i wymieszać (patrz uwaga 9.3). Przefiltrować 5–10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (ppkt 4.2). Przejść do oznaczenia HPLC (ppkt 5.3).

5.2.2. Premiksy (zawartość 1 % amprolium)

Odważyć z dokładnością do 0,001 g, 1–4 g premiksu w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej o pojemności 500 ml i dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i umieścić na 1 godzinę na wytrząsarce lub w mieszadle magnetycznym (ppkt 4.5). Rozcieńczyć odpowiednią część ekstraktu fazą ruchomą (ppkt 3.6) do zawartości amprolium 0,5–2 µg/ml i wymieszać. Przefiltrować 5–10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (ppkt 4.2). Przejść do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.3).

5.3. *Oznaczanie HPLC*

5.3.1. Parametry:

Wskazane jest zachowanie następujących warunków; można też stosować inne warunki o ile dają one takie same wyniki.

Kolumna do chromatografii 125 mm 4 mm, Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 µm, lub równoważna (ppkt 4.1.1):

Faza ruchoma (ppkt 3.6): Mieszanina acetonitrylu (ppkt 3.2), roztworu diwodorofosforanu sodu (ppkt 3.4) i roztworu nadchloranu sodu (ppkt 3.5) 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Szybkość przepływu: 0,7–1 ml/min.

Długość fali detektora: 264 nm.

Ilość wprowadzona: 100 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego wprowadzając w tym celu kilkakrotnie roztwór wzorcowy (ppkt 3.7.3) zawierający 1,0 µg/ml dopóki nie uzyska się stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa wzorcowa

Wprowadzić kilkakrotnie każdy roztwór wzorcowy (ppkt 3.7.3) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą wzorcową z wykorzystaniem średnich wysokości pików roztworów wzorcowych jako rzędnych oraz odpowiadających im stężeń w µg/ml jako odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Wprowadzić kilkakrotnie ekstrakt próbki (ppkt 5.2) z użyciem takich samych objętości jak dla roztworów wzorcowych i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla pików amprolium.

6. Obliczanie wyników

Ze średnich wysokości pików amprolium roztworu próbki oznaczyć stężenie roztworu próbki w µg/ml korzystając z wykresu wzorcowego (ppkt 5.3.2).

Zawartość amprolium w próbce w mg/kg otrzymuje się z następującego wzoru:

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

gdzie:

V = objętość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.8) w ml wg ppkt 5.2 (tzn. 200 ml)

β = stężenie amprolium w ekstrakcie próbki (ppkt 5.2) w µg/ml

f = współczynnik rozcieńczenia wg ppkt 5.2

m = masa badanej porcji w g

7. Ocena poprawności wyników

7.1. Identyfikacja

Identyfikacja analitu może być potwierdzona przez równoległą chromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, za pomocą którego porównuje się widma ekstraktu próbki (ppkt 5.2) i roztworu wzorcowego (ppkt 3.7.3) zawierającego 2,0 µg/ml.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Do ekstraktu próbki (ppkt 5.2) dodawana jest odpowiednia ilość roztworu wzorcowego (ppkt 3.7.3). Ilość dodanego amprolium powinna być zbliżona do ilości amprolium stwierdzonej w ekstrakcie próbki.

Tylko wysokość pików amprolium powinna być wzmocniona po uwzględnieniu dodanej ilości i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % szerokości uzyskanej dla próbki niewzbogaconej.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki są oceniane w oparciu o następujące kryteria:

- Długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i wzorcowym widmom odnotowana dla wierzchołka pików na chromatogramie musi być taka sama w ramach zdolności rozdzielczej systemu detekcyjnego. Detekcja diodowa mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm.
- 210–320 nm widma próbki i wzorca odnotowane u wierzchołka pików chromatogramu nie mogą różnić się w tych częściach widma w zakresie 10–100 % absorpcji względnej. To kryterium zostaje spełnione wówczas, gdy występują te same wartości maksymalne i w żadnym obserwowanym punkcie odchylenia między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji wzorcowego analitu.
- 210–320 nm widma krzywej rosnącej, szczytu i krzywej malejącej pików utworzonego przez ekstrakt próbki nie mogą różnić się w tych częściach widma w zakresie 10–100 % absorpcji względnej. To kryterium zostaje spełnione wówczas, gdy występują te same maksymalne wartości i w żadnym obserwowanym punkcie odchylenia między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji widma szczytu pików.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie zostanie spełnione, obecność badanej substancji nie może być potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń tej samej próbki nie może przekraczać:

- 15 % względem większej zawartości amprolium 25 mg/kg–500 mg/kg
- 75 mg/kg dla zawartości amprolium między 500 mg/kg a 1000 mg/kg
- 7,5 % względem większej zawartości amprolium powyżej 1000 mg/kg

7.3. Odzysk

W przypadku próbki wzbogaconej (ślepej) odzysk powinien wynosić, co najmniej 90 %.

8. Wyniki analizy zbiorowej

Przeprowadzono badanie trzech pasz dla drobiu (próbki 1–3), paszy mineralnej (próbka 4) i premiksu (próbka 5) w kilku różnych laboratoriach. Wyniki są zamieszczone w poniższej tabeli:

	Próbka 1 (ślepa)	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
średnia [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
Zawartość nominalna [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: liczba laboratoriów.

N: liczba pojedynczych oznaczeń.

s_r : odchylenie standardowe powtarzalności.

CV_r : współczynnik zmienności powtarzalności.

s_R : odchylenie standardowe odtwarzalności.

CV_R : współczynnik zmienności odtwarzalności.

9. Uwagi

- 9.1. Jeżeli próbka zawiera tiaminę, pik tiaminy w chromatogramie znajduje się przed pikiem amprolium. W tej metodzie amprolium i tiamina muszą być rozdzielone. Jeżeli amprolium i tiamina nie zostaną rozdzielone w kolumnie (ppkt 4.1.1) użytej w tej metodzie, zastąpić do 50 % acetonitrylu w fazie ruchomej (ppkt 3.6) metanolem.
- 9.2. Według Farmakopei Brytyjskiej widmo roztworu amprolium ($c = 0,02$ mol/l) w kwasie chlorowodorowym ($c = 0,1$ mol/l) wykazuje wartości maksymalne przy 246 nm i 262 nm. Absorbancja wyniesie 0,84 przy 246 nm i 0,80 przy 262 nm.
- 9.3. Ekstrakt musi zawsze być rozcieńczony fazą ruchomą, gdyż w przeciwnym razie czas retencji pików amprolium może się znacznie przesunąć z uwagi na zmiany w sile jonowej.

CZĘŚĆ B**OZNACZANIE DIKLAZURILU**

(+)-4-chlorofenyl [2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl) fenyl] acetonitryl

1. Cel i zakres

Metoda ta jest stosowana do oznaczenia diklazurilu w paszach i premiksach. Granice wykrywalności wynoszą 0,1 mg/kg, a granica oznaczenia wynosi 0,5 mg/kg.

2. Zasada

Po dodaniu wewnętrznego wzorca próbka jest poddawana ekstrakcji za pomocą kwaśnego metanolu. W przypadku pasz podwielokrotna część ekstraktu zostaje oczyszczona na filtrze ekstrakcyjnym stałym C₁₈. Diklazuril zostaje wymyty z filtra za pomocą mieszaniny zakwaszonego metanolu i wody. Po odparowaniu sucha pozostałość jest rozpuszczana w DMF/wodzie. W przypadku premiksów ekstrakt jest odparowywany i sucha pozostałość jest rozpuszczana w DMF/wodzie. Zawartość diklazurilu jest oznaczana metodą wysokosprawnej ekstrakcyjnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. Odczynniki

- 3.1. Woda, czystość HPLC.
- 3.2. Octan amonu.
- 3.3. Kwaśny siarczan tetrabutylamonu (TBHS).
- 3.4. Nityl octowy czystości w HPLC.
- 3.5. Metanol czystości w HPLC.
- 3.6. N,N-dimetyloformamid (DMF).
- 3.7. Kwas solny, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.
- 3.8. Substancja wzorcowa: diklazuril II-24: (+)-4-chlorofenyl-[2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl) fenyl] acetonitryl o gwarantowanej czystości, E771.
 - 3.8.1. Podstawowy roztwór mianowany diklazurilu, 500 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg wzorcowego diklazurilu (ppkt 3.8) w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (ppkt 3.6) i uzupełnić do znaku DMF (ppkt 3.6), i zamieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przelać do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.8.2. Roztwór mianowany diklazurilu, 50 µg/ml.

Przenieść 5,00 ml podstawowego roztworu mianowanego diklazurilu (ppkt 3.8.1.) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do wymaganej objętości DMF (ppkt 3.6) i wymieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przelać do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.9. Wewnętrzna substancja wzorcowa: 2,6 dichloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2(3H)-yl)- α -metylobenzeno-acetonitryl.

3.9.1. Roztwór podstawowy wewnętrznego wzorca, 500 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej (ppkt 3.9) w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (ppkt 3.6) i uzupełnić do kreski DMF (ppkt 3.6) i zamieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przelać do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 µg/ml.

Przenieść 5,00 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do wymaganej objętości DMF (ppkt 3.6) i wymieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przelać do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.9.3. Roztwór mianowany wzorca wewnętrznego do premiksów, p/1000 mg/ml (p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg).

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, p/10 mg substancji wzorcowej do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w DMF (ppkt 3.6) w kąpeli ultradźwiękowej (ppkt 4.6), uzupełnić DMF do wymaganej objętości i zamieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przelać do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

3.10. Roztwór wzorcowy, 2 µg/ml.

Odmierzyć pipetą 2,00 ml roztworu mianowanego diklazurilu (ppkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu mianowanego wzorca wewnętrznego (ppkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 16 ml DMF (ppkt 3.6), uzupełnić do znaku wodą i zamieszać. Roztwór należy sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Stały wkład ekstrakcyjny C₁₈, np. Bond Elute, wymiary: 1 cm³, masa sorbentu: 100 mg.

3.12. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny: kwaśny metanol.

Wprowadzić za pomocą pipety 5,0 ml kwasu solnego (ppkt 3.7) do 1000 ml metanolu (ppkt 3.5) i wymieszać.

3.13. Faza ruchoma do HPLC.

Eluent A: octan amonu – roztwór kwaśnego siarczanu tetrahydroamoniowego.

3.13.1. Rozpuścić 5 g octanu amonu (ppkt 3.2) i 3,4 g TBHS (ppkt 3.3) w 1000 ml wody (ppkt 3.1) i wymieszać.

3.13.2. Eluent B: acetonitryl (ppkt 3.4).

3.13.3. Eluent C: metanol (ppkt 3.5).

4. Aparatura

4.1. Wytrząsarka mechaniczna.

4.2. Aparat do HPLC.

4.2.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm, 100 mm 4,6 mm lub równoważne.

4.2.2. Detektor promieniowania UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy.

4.3. Obrotowa wyparka próżniowa.

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm.

4.5. Próźniowy przewód rozgałęźny.

4.6. Łażnia ultradźwiękowa.

5. Procedura

5.1. Informacje ogólne

5.1.1. Ślepa próba

Należy przeprowadzić analizę paszy stanowiącej ślepa próbę w celu upewnienia się, czy nie zawiera diklazurilu lub substancji przeszkadzających. Rodzaj paszy stanowiącej ślepa próbę powinien być podobny do rodzaju próbki, a analiza powinna potwierdzić brak diklazurilu lub substancji przeszkadzających.

5.1.2. Test odzysku

Test odzysku powinien być przeprowadzony na drodze analizy ślepej próby, do której dodano diklazuril w ilości podobnej do zawartej w badanej próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 1 mg/kg dodać 0,1 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.8.1) do 50 g ślepej próby, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie mieszać jeszcze kilkakrotnie przed użyciem (ppkt 5.2).

Jeżeli ślepa próba zbliżona typem do próbki nie jest dostępna (patrz 5.1.1), test odzysku można przeprowadzić stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest uzupełniana diklazurilem w ilości podobnej do zawartej w badanej próbce. Próbka ta jest poddawana analizie podobnie jak próbka bez zwiększonej zawartości diklazurilu i odzysk można być obliczyć przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze

Odważyć około 50 g próbki z dokładnością do 0,01 g. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (ppkt 3.9.2), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Umieścić mieszaninę na wytrząsarce (ppkt 4.1) na noc. Pozostawić na 10 minut dla odstania. Przełać 20 ml sklarowanej cieczy do odpowiedniego szklanego naczynia i rozcieńczyć 20 ml wody. Przenieść roztwór na wkład ekstrakcyjny (ppkt 3.11) i przepuścić przezeń stosując podciśnienie (ppkt 4.5). Przepłukać wkład 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.12) i wody, 65 + 35 (V + V). Odrzucić zebrane frakcje i poddać związki elucji 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.12) i wody, 80 + 20 (V + V). Odparować tę frakcję do suchości za pomocą wyparki obrotowej (ppkt 4.3) w temperaturze 60 °C. Rozpuścić suchą pozostałość w 1,0 ml DMF (ppkt 3.6), dodać 1,5 ml wody (ppkt 3.1) i wymieszać. Przefiltrować przez filtr membranowy (ppkt 4.4). Przystąpić do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć około 1 g próbki z dokładnością do 0,001 g. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml wewnętrznego roztworu mianowanego (ppkt 3.9.3), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (ppkt 3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Umieścić mieszaninę na wytrząsarce (ppkt 4.1) na całą noc. Pozostawić na 10 minut dla odstania. Przełać 10 000/p ml (p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg) sklarowanej cieczy do kolby okrągłodennej o odpowiedniej pojemności. Odparować tę frakcję do suchości pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 60 °C za pomocą wyparki obrotowej (ppkt 4.3). Ponownie rozpuścić suchą pozostałość w 10,0 ml DMF (ppkt 3.6), dodać 15,0 ml wody (ppkt 3.1) i wymieszać. Przystąpić do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.3).

5.3. Oznaczanie za pomocą HPLC

5.3.1. Parametry

W celach orientacyjnych proponuje się zachowanie podanych niżej warunków; można też stosować inne warunki o ile dają one takie same wyniki.

— Kolumna do chromatografii 100 mm 4,6 mm, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm, lub równoważna cieczowej (ppkt 4.2.1):

— Faza ruchoma:	Eluent A (ppkt 3.13.1):	Wodny roztwór octanu amonowego i kwaśnego siarczanu tetrabutylamoniowego
	Eluent B (ppkt 3.13.2):	acetonitryl
	Eluent C (ppkt 3.13.3):	metanol

- Sposób wymywania:
 - frakcjonowanie w gradiencie liniowym
 - warunki wstępne: $A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)$
 - po 10 minutach prowadzić wymywanie frakcyjne przez 30 minut do:

$$A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)$$
 - Płukać za pomocą B przez 10 minut
- Natężenie przepływu: 1,5–2 ml/min
- Ilość wprowadzona: 20 μ l
- Długość fali czujnika: 280 ml

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego wprowadzając w tym celu kilkakrotnie roztwór wzorcowy (ppkt 3.10) zawierający 2 μ g/ml dopóki nie uzyska się stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.3.2. Roztwór wzorcowy

Wprowadzić kilkakrotnie 20 μ l roztworu wzorcowego (ppkt 3.10) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla diklaurilu i wewnętrzne piki wzorcowe.

5.3.3. Roztwór próbki

Wprowadzić kilkakrotnie 20 μ l roztworu próbki (ppkt 5.2.1 lub 5.2.2) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla diklaurilu i wewnętrzne piki wzorcowe.

6. Obliczenia wyników

6.1. Pasze

Zawartość diklaurilu w próbce, wyrażoną w mg/kg, otrzymuje się z następującego wzoru:

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

gdzie:

h_{ds} = wysokość pików (obszaru) dla diklaurilu w roztworze próbki (ppkt 5.2.1)

h_{is} = wysokość pików (obszaru) dla wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (ppkt 5.2.1)

h_{dc} = wysokość pików (obszaru) dla diklaurilu w roztworze wzorcowym (ppkt 3.10)

h_{ic} = wysokość pików (obszaru) dla wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym (ppkt 3.10)

β_{dc} = stężenie diklaurilu w roztworze wzorcowym w μ g/ml (ppkt 3.10)

m = masa badanej porcji w g

V = objętość ekstraktu próbki według ppkt 5.2.1 (tzn. 2,5 ml)

6.2. Premiksy

Zawartość diklaurilu w próbce, wyrażoną w mg/kg, otrzymuje się z następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{ds} \cdot h_{ic} \cdot \beta_{dc} \cdot 0.02 V \cdot p}{h_{is} \cdot h_{dc} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

h_{dc} = wysokość pików (obszaru) dla diklaurilu w roztworze wzorcowym (ppkt 3.10)

h_{ic} = wysokość pików (obszaru) dla wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym (ppkt 3.10)

h_{ds} = wysokość pików (obszaru) dla diklaurilu w roztworze próbki (ppkt 5.2.2)

h_{is} = wysokość pików (obszaru) dla wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (ppkt 5.2.2)

β_{dc} = stężenie diklaurilu w roztworze wzorcowym w μ g/ml (ppkt 3.10)

m = masa badanej porcji w g

V = objętość ekstraktu próbki według ppkt 5.2.1 (tzn. 25 ml)

p = nominalna zawartość diklaurilu w mg/kg w premiksie

7. Ocena poprawności wyników

7.1. Identyczność

Identyczność analitu może być potwierdzona przez równoległą chromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, za pomocą którego porównuje się widma ekstraktu próbki (ppkt 5.2.1 lub 5.2.2) i roztworu wzorcowego (ppkt 3.10).

7.1.1. Chromatografia równoległa

Do ekstraktu próbki (ppkt 5.2.1 lub 5.2.2) dodawana jest odpowiednia ilość roztworu wzorcowego (ppkt 3.10). Ilość dodanego diklazurilu powinna być zbliżona do ilości diklazurilu stwierdzonej w ekstrakcie próbki.

Jedynie wysokości pików diklazurilu i pików wzorca wewnętrznego powinny być wzmocnione po uwzględnieniu dodanej ilości i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach $\pm 10\%$ szerokości pierwotnej pików diklazurilu lub pików wzorca wewnętrznego niewzmacnianego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki są oceniane w oparciu o następujące kryteria:

- Długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i wzorcowym widmom dla wierzchołka pików na chromatografii musi być taka sama w ramach marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Detekcja diodowa mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm.
- 230–320 nm widma próbki i wzorca u wierzchołka pików chromatogramu nie może różnić się w tych częściach widma w zakresie 10–100 % absorbancji względnej. To kryterium zostaje spełnione wówczas, gdy występują te same maksymalne wartości i w żadnym obserwowanym punkcie odchylenia między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorbancji wzorcowego analitu.
- 230–320 nm widma krzywej rosnącej, szczytu i krzywej malejącej pików utworzonego przez ekstrakt próbki nie mogą różnić się w tych częściach widma w zakresie 10–100 % absorbancji względnej. To kryterium zostaje spełnione wówczas, gdy występują te same maksymalne wartości i w żadnym obserwowanym punkcie odchylenia między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorbancji widma szczytu pików.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie zostanie spełnione, wówczas obecność analizowanej substancji nie zostaje potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń dla tej samej próbki nie może przekraczać:

- 30 % względem większej zawartości diklazurilu od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg
- 0,75 mg/kg dla zawartości diklazurilu między 2,5 mg/kg do 5 mg/kg
- 15 % względem większej zawartości diklazurilu powyżej 5 mg/kg

7.3. Odzysk

W przypadku wzbogaconej próbki (ślepej) odzysk powinien wynosić co najmniej 80 %.

8. Wyniki badań porównawczych

Przeprowadzono badania, podczas których przeanalizowano pięć próbek w 11 laboratoriach. Były to próbki z dwóch premiksów; jeden był wymieszany z głównym składnikiem organicznym (O 100), a drugi z głównym składnikiem nieorganicznym (A 100). Zawartość teoretyczna diklazurilu wynosiła 100 mg na kg. Trzy mieszanki paszowe dla drobiu zostały sporządzone przez trzech różnych producentów (NL) (L1/Z1/K1). Teoretyczna zawartość diklazurilu wynosiła 1 mg/kg. Laboratoria zostały pouczone, aby przeprowadzić analizę każdej próbki raz lub dwukrotnie. (Bardziej szczegółowe informacje z tej analizy można znaleźć w *Dzienniku AOAC International*, Tom 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361). Wyniki są zamieszczone w poniższej tabeli:

	Próbka 1 A 100	Próbka 2 O 100	Próbka 3 L 1	Próbka 4 Z 1	Próbka 5 K 1
L	11	11	11	11	6
N	19	18	19	19	12
Średnia	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	0,67	13,65
Zawartość nominalna (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: liczba laboratoriów.

N: liczba pojedynczych wartości.

s_r: odchylenie standardowe powtarzalności.

CV_r: współczynnik zmienności powtarzalności.

S_R: odchylenie standardowe odtwarzalności.

CV_R: współczynnik zmienności odtwarzalności.

9. Uwagi

Należy uprzednio udowodnić, że reakcja diklazurilu jest liniowa w zakresie mierzonych stężeń.

CZEŚĆ C

OZNACZANIE KARBADOKSU

N¹, N⁴ dwutlenek metylo 3-(2-chinoksalinylnetyleno) pikrynianu

1. Cel i zakres

Metoda ta jest stosowana do oznaczania karbadoksu w paszach, premiksach i innych preparatach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, a granica oznaczania wynosi 10 mg/kg.

2. Zasada

Próbka równoważona jest wodą i poddawana ekstrakcji za pomocą acetonitrylu i metanolu. W przypadku pasz odpowiednia część przefiltrowanego ekstraktu jest oczyszczana na kolumnie z tlenku glinu. W przypadku premiksów i innych preparatów odpowiednia część przefiltrowanego ekstraktu zostaje rozcieńczona do odpowiedniego stężenia wodą, metanolem i acetonitrylem. Zawartość karbadoksu oznaczana jest metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej o odwróconej fazie (HPLC) przy użyciu detektora promieniowania UV.

3. Odczynniki

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl, czystość HPLC.

3.3. Kwas octowy, w = 100 %.

3.4. Tlenek glinu: obojętny, klasa aktywności I.

3.5. Mieszanina metanol-acetonitryl 1 + 1 (v + v).

Zmieszać 500 ml metanolu (ppkt 3.1) z 500 ml acetonitrylu (ppkt 3.2).

3.6. Kwas octowy, σ = 10 %.

Rozcieńczyć 10 ml kwasu octowego (ppkt 3.3) wodą do 100 ml.

3.7. Octan sodu, CH₃COONa.

- 3.8. Woda, czystość HPLC.
- 3.9. Roztwór buforu octanowego, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.
Rozpuścić 0,82 g octanu sodu (ppkt 3.7) w wodzie (ppkt 3.8) i doprowadzić pH do 6,0 kwasem octowym (ppkt 3.6). Przełąć do 1000-mililitrowej kolby miarowej, uzupełnić wodą (ppkt 3.8) do podziałki i wymieszać.
- 3.10. Faza ruchoma dla HPLC.
Zmieszać 825 ml roztworu buforu octanowego (ppkt 3.9) i 175 ml acetonitrylu (ppkt 3.2). Przefiltrować przez filtr 0,22 μm (ppkt 4.5) i odgazować roztwór (np. w kąpeli ultradźwiękowej, przez co najmniej 10 minut).
- 3.11. Substancja wzorcowa.
Czysty karbadoks: N^1 , N^4 dwutlenek metylo 3-(2-chinoksaliny)metyleno pikrynianu, E 850.
- 3.11.1. Podstawowy roztwór mianowany karbadoksu, 100 $\mu\text{g/ml}$. (patrz procedura pkt 5)
Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg wzorcowego karbadoksu (ppkt 3.11) w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić w metanolu-acetonitrylu (ppkt 3.5) przez działanie ultradźwięków (ppkt 4.7), następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski metanolem-acetonitrylem (ppkt 3.5) i wymieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową lub przełąć do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.
- 3.11.2. Roztwory wzorcowe
Przenieść 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.11.1) do kilku kolb miarowych o pojemności 100 ml. Dodać 30 ml wody, uzupełnić do znaku metanolem-acetonitrylem (ppkt 3.5) i zamieszać. Zawinąć kolbę w folię aluminiową. Roztwory te odpowiadają 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu. Roztwory wzorcowe muszą być sporządzane bezpośrednio przed użyciem.
- Uwaga:*
W celu oznaczania karbadoksu w paszach zawierających mniej niż 10 mg/kg, należy użyć roztworów wzorcowych słabszych niż 2,0 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Mieszanina woda-[metanol-acenitryl] (ppkt 3.5), 300 + 700 (v + v)
Zmieszać 300 ml wody z 700 ml mieszaniny metanol-acetonitryl (ppkt 3.5).
- 4. Aparatura**
- 4.1. Wyrząsarka laboratoryjna lub mieszadło magnetyczne.
- 4.2. Bibuła filtracyjna z włóknem szklanym (Whatman GF/A lub równoważna).
- 4.3. Szklana kolumna (dł. 300–400 mm, wewnętrzna średnica ok 10 mm) z wkładem ze szkła spiekane oraz zaworem czerpalnym.
Uwaga:
można użyć również kolumny szklanej z kurkiem lub końcem ściętym; w takim przypadku w dolnym końcu umieszcza się zatyczkę z wełny szklanej, ubitą szklanym prętem
- 4.4. Sprzęt do HPLC z systemem wtryskowym do porcji o objętości 20 μl .
- 4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm 4 mm, C_{18} , wypełnienie 10 μm , lub równoważne.
- 4.4.2. Detektor promieniowania UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy pracujący w zakresie 225–400 nm.
- 4.5. Filtr membranowy, 0,22 μm .
- 4.6. Filtr membranowy, 0,45 μm .
- 4.7. Łaźnia ultradźwiękowa.
- 5. Procedura**
- Uwaga:*
Karbadoks jest wrażliwy na działanie światła. Wszystkie czynności wykonywać w przyćmionym świetle lub używać ciemnego szkła lub szkła owiniętego folią aluminiową.
- 5.1. *Informacje ogólne*

5.1.1. Ślepa próba.

Do celów testu odzysku należy przeprowadzić analizę ślepej próby (ppkt 5.1.2) w celu upewnienia się, czy nie występują w niej karbadoks lub substancje przeszkadzające. Rodzaj paszy do sporządzenia ślepej próby powinien być podobny do rodzaju paszy badanej próbki, a analiza powinna potwierdzić brak karbadoksu lub substancji przeszkadzających.

5.1.2. Test odzysku.

Test odzysk powinien być przeprowadzony na drodze analizy ślepej próby (ppkt 5.1.1), do której dodano ilość karbadoksu podobną do paszy zawartej w badanej próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 50 mg/kg dodać 5,0 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.11.1) do kolby stożkowej 200 ml. Odparować roztwór do około 0,5 ml w strumieniu azotu. Dodać 10 g ślepej próby, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (ppkt 5.2).

Jeżeli pasza do sporządzenia ślepej próby zbliżona typem do badanej próbki (patrz 5.1.1) nie jest dostępna, test odzysku można przeprowadzić stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest uzupełniana ilością karbadoksu zbliżoną do zawartej w próbce. Próbka ta jest poddawana analizie wraz z próbką niewzbogacaną karbadoksem i odzysk można obliczyć przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze.

Odważyć około 10 g próbki z dokładnością do 0,01 g. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml, dodać 15,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu-acetonitrylu (ppkt 3.5), zamknąć korkiem i pozostawić mieszaninę na wytrząsarce (ppkt 4.1) lub mieszadło magnetycznym na 30 minut. Przefiltrować przez bibułę z włóknem szklanym (ppkt 4.2). Zachować ten roztwór do etapu oczyszczania (ppkt 5.3).

5.2.2. Premiksy (0,1–2,0 %).

Odważyć z dokładnością do 0,01 g około 1 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu-acetonitrylu (ppkt 3.5), zamknąć korkiem i pozostawić mieszaninę na wytrząsarce (ppkt 4.1) lub mieszadło magnetycznym na 30 minut. Przefiltrować przez bibułę z włóknem szklanym (ppkt 4.2). Pipetą przelać część odfiltrowanego ekstraktu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 15,0 ml wody, uzupełnić do kreski metanolem i acetonitrylem (ppkt 3.5) i wymieszać. Stężenie karbadoksu w roztworze końcowym powinno wynieść około 10 µg/ml. Część filtrowana jest przez filtr 0,45 µm (ppkt 4.6). Przystąpić do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.4).

5.2.3. Inne preparaty (> 2,0 %).

Odważyć około 0,2 g z dokładnością do 0,001 g niezmielonej próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml, dodać 45,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 105,0 ml mieszaniny metanolu-acetonitrylu (ppkt 3.5), zamknąć korkiem, poddawać działaniu ultradźwięków (ppkt 4.7) przez 15 minut i pozostawić mieszaninę na wytrząsarce (ppkt 4.1) lub mieszadło magnetycznym na 15 minut. Przefiltrować przez bibułę z włóknem szklanym (ppkt 4.2). Rozcieńczyć odpowiednio część odfiltrowanego ekstraktu mieszaniną wody, metanolu i acetonitrylu (ppkt 3.12) do ostatecznego stężenia karbadoksu 10–15 µg/ml (w preparacie 10-procentowym współczynnik rozcieńczenia wynosi 10). Odpowiednia część filtrowana jest przez filtr 0,45 µm (ppkt 4.6). Przystąpić do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.4).

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenku glinu.

Odważyć 4 g tlenku glinu (ppkt 3.4) i przenieść do szklanej kolumny (ppkt 4.3).

5.3.2. Oczyszczanie próbki.

Umieścić 15 ml odfiltrowanego ekstraktu (ppkt 5.2.1) w kolumnie z tlenkiem glinu i usunąć pierwsze 2 ml eluentu. Zebrać następne 5 ml i odfiltrować część przez filtr 0,45 µm (ppkt 4.6). Przystąpić do oznaczania za pomocą HPLC (ppkt 5.4).

5.4. Oznaczanie HPLC

5.4.1. Parametry.

W celach orientacyjnych proponuje się zachowanie następujących warunków; można też stosować inne warunki o ile dają one takie same wyniki.

Kolumna do chromatografii 300 mm 4 mm, C18, wypełnienie 10 µm, lub równoważne.
cieczowej (ppkt 4.1.1):

Faza ruchoma (ppkt 3.10): Mieszanina roztworu buforu octanowego (ppkt 3.9) i acetonitrylu (ppkt 3.2), 825 + 175 (v + v).

Szybkość przepływu: 1,5–2 ml/min.

Ilość wprowadzona: 365 nm.

Długość fali: 20 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego wprowadzając w tym celu kilkakrotnie roztwór wzorcowy (ppkt 3.11.2) zawierający 5,0 µg/ml dopóki nie uzyska się stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.4.2. Wykres wzorcowania.

Wprowadzić kilkakrotnie każdy roztwór wzorcowy (ppkt 3.11.2) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla każdego stężenia. Wyznaczyć krzywą wzorcową z wykorzystaniem średnich wysokości pików roztworów wzorcowych jako rzędnych oraz odpowiadających im stężeń w µg/ml jako odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki.

Wprowadzić kilkakrotnie roztwór próbki [pasz (ppkt 5.3.2), premiksu (ppkt 5.2.2) lub preparatu (ppkt 5.2.3)] i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla pików karbadoksu.

6. Obliczenia wyników

Ze średnich wysokości pików dla karbadoksu w roztworze próbki oznaczyć jego stężenie w roztworze próbki w µg/ml w odniesieniu do wykresu wzorcowego (ppkt 5.4.2).

6.1. Pasze.

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, otrzymuje się z następującego wzoru:

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

gdzie:

β = stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki (ppkt 5.3.2) w µg/ml.

V_1 = objętość ekstraktu próbki w ml (tzn. 50).

m = masa badanej porcji w gramach.

6.2. Premiksy i inne preparaty.

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, otrzymuje się z następującego wzoru:

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

gdzie:

β = stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki w µg/ml (ppkt 5.2.2 lub 5.2.3).

V_2 = objętość ekstraktu próbki w ml (tzn. 50 dla premiksów i 150 dla innych preparatów).

f = współczynnik rozcieńczania zgodnie z ppkt 5.2.2 (premiksy) lub ppkt 5.2.3 (preparaty).

m = masa badanej porcji w g.

Tabela 2: Wyniki analiz zbiorowych premiksów i preparatów

	Premiksy				Preparaty		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Średnia (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (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
Zawartość nominalna (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: liczba laboratoriów

N: liczba pojedynczych oznaczeń

 S_r : odchylenie standardowe powtarzalności CV_r : współczynnik zmienności powtarzalności S_R : odchylenie standardowe odtwarzalności CV_R : współczynnik zmienności odtwarzalności