

31993L0117

L 329/54

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

30.12.1993

**DVANÁSTA SMERNICA KOMISIE 93/117/ES****zo 17. decembra 1993,****ktorou sa stanovujú analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív**

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

Článok 2

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód spoločenstva pre odber vzoriek a analýzu na účely úradnej kontroly krmív<sup>(1)</sup>, naposledy zmenenú a doplnenú nariadením (EHS) č. 3768/85<sup>(2)</sup>, a najmä na jej článok 2,

keďže, smernica 70/373/EHS vyžaduje, aby úradné kontroly krmív s cieľom kontroly súladu s požiadavkami, ktoré vznikli na základe ustanovení týkajúcich sa kvality a zloženia stanovenej zákonom, iným právnym predpisom alebo správnym opatrením, sa musia vykonávať s použitím metód vzorkovania a analytických metód spoločenstva;

keďže, sa majú určiť analytické metódy spoločenstva pre doplnkové látky robenidín a metylbenzoquat určené na kontrolu súladu s podmienkami jeho používania v krmivách;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty budú požadovať, aby sa analýzy vykonané počas úradných kontrol krmív s cieľom identifikácie obsahu robenidínu a metylbenzoquatu vykonávali pomocou metód popísaných v prílohe k tejto smernici.

Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 30. novembra 1994 a bezodkladne to oznámia Komisii.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu. Podrobnosti o odkaze upravujú členské štáty.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť tretí deň po jej zverejnení v Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev.

V Bruseli 17. decembra 1993

Za Komisiu  
René STEICHEN  
člen Komisie

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.

<sup>(2)</sup> Ú. v. ES L 362, 31.12.1985, s. 8.

## PRÍLOHA

## 1. STANOVENIE ROBENIDÍNU

**1,3-bis (4-chlórbenzylidenamino) guanidín hydrochlorid****1. Predmet metódy**

Táto metóda je určená na stanovenie robenidínu v krmivách, dolná medza stanoviteľnosti je 5 mg/kg.

**2. Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje s okysleným roztokom metanolu. Extrakt sa vysuší a alikvotná časť sa podrobí čisteniu na kolóne s oxidom hlinitým. Robenidín sa vymýva z kolóny metanolom, zakoncentruje sa a doplní sa na vhodný objem mobilnou fázou. Obsah robenidínu sa stanoví pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie s obrátenými fázami (HPLC) a použitím UV detektora.

**3. Chemikálie**3.1. *Metanol*3.2. *Kyslený metanol*

Do 500 ml odmernej banky sa napipetuje 4,0 ml kyseliny chlorovodíkovej ( $P_{20C}$ , 1,18 g/ml), doplní sa po značku s metanolom (3.1) a premieša. Tento roztok sa čerstvo pripraví pred použitím.

3.3. *Acetonitril, čistoty HPLC*3.4. *Molekulové sito*

Typ 3A, sklené guľičky 8 – 12 mešov (sklené guľičky 1,6 – 2,5 mm, kryštalický hlinitokremičitan, priemer pórov 0,3 mm)

3.5. *Oxid hlinitý: kyslý: aktivita triedy I pre stĺpcovú chromatografu*

Do vhodnej nádoby sa naváži 100 g oxidu hlinitého a pridá sa 2,0 ml vody. Zazátkujte a trepte po dobu približne 20 minút. Uchovávajú sa v dobre uzatvorenej nádobe.

3.6. *Roztok dihydro- fosforečnanu draselného,  $c = 0,025 \text{ mol/l}$* 

V 1 000 ml odmernej banke sa rozpustí 3,40 g dihydro- fosforečnanu draselného vo vode (čistoty HPLC), doplní sa po značku a premieša.

3.7. *Roztok hydro fosforečnanu disodného,  $c = 0,025 \text{ mol/l}$* 

V 1 000 ml odmernej banke sa rozpustí 3,55 g bezvodého (alebo 4,45 g dihydrátu alebo 8,95 g dodekahydrátu) hydrofosforečnanu disodného vo vode (čistoty HPLC), doplní sa po značku a premieša.

3.8. *Mobilná fáza HPLC*

Zmiešajú sa spolu nasledovné chemikálie:

650 ml acetonitrilu (3.3),

250 ml vody (čistoty HPLC),

50 ml roztoku dihydrofosforečnanu draselného (3.6),

50 ml roztoku hydrofosforečnanu disodného (3.7),

Mobilná fáza sa prefiltruje cez 0,22  $\mu\text{m}$  filter (4.6) a roztok sa odplyní (napr. vystavením účinkom ultrazvuku po dobu 10 minút).

3.9. *Štandardná látka*

Čistý robenidín 1.3-bis [(4-chlórbenzylidénamino)-guanidín hydrochlorid, E 750.

### 3.9.1. Základný štandardný roztok robenidínu 300 µg/ml:

Naváži sa s presnosťou na 0,1 mg, 30 mg štandardnej látky robenidínu (3.9). Rozpustí sa v kyslo metanole (3.2) v 100 ml odmernej banke, doplní sa značkou tým istým rozpúšťadlom a premieša. Banka sa zabalí do hliníkovej fólie a skladuje na tmavom mieste.

### 3.9.2. Pracovný štandardný roztok robenidínu: 12 µg/ml:

Do 250 ml odmernej banky sa napipetuje 10,0 ml základného štandardného roztoku (3.9.1), doplní sa po značku mobilnou fázou (3.8) a premieša. Banka sa zabalí do hliníkovej fólie a skladuje na tmavom mieste.

### 3.9.3. Kalibračné roztoky

Do sady 50 ml odmerných baniek sa napipetuje 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 a 25,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.9.2). Doplnia sa po značku mobilnou fázou (3.8) a zmiešajú. Tieto roztoky zodpovedajú koncentrácii robenidínu 1,2, 2,4, 3,6, 4,8, resp. 6,0 µg/ml. Tieto roztoky musia byť čerstvo pripravené pred použitím.

## 4. Prístroje

### 4.1. Sklenená kolóna

Vyrobená z tmavého skla ukončená uzatváracím kohútom a zásobníkom s obsahom približne 150 ml, vnútorný priemer 10 – 15 mm, dĺžka 250 mm.

### 4.2. Laboratórna trepačka

### 4.3. Rotačná vákuová odparka

### 4.4. Zariadenie na HPLC s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s dióde array detektorom pracujúci v rozsahu 250 až 400 nm.

#### 4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu: 300 mm x 4 mm, C<sub>18</sub>, 10 mm náplň alebo ekvivalentná.

### 4.5. Filtračný papier zo skleneného vlákna (Whatman GF/A alebo ekvivalentný)

### 4.6. Membránové filtre, 0,22 mm

### 4.7. Membránové filtre, 0,45 mm

## 5. Postup

*Poznámka:* Robenidín je citlivý na svetlo. Pri všetkých operáciách sa musí používať laboratórne sklo zo žltého hliníkokremičitého skla.

### 5.1. Všeobecné

#### 5.1.1. Musí sa vykonať analýza slepej vzorky s cieľom skontrolovať, že vo vzorke nie je prítomný ani robenidín a ani interferujúce látky.

#### 5.1.2. Skúška návratnosti sa musí vykonať analyzovaním krmiva bez robenidínu – slepej vzorky (5.1.1.), ktorý sa obohatí prídavkom takeého množstva robenidínu, ktoré je podobné množstvu prítomnému vo vzorke. S cieľom obohatenia na úroveň 60 mg/kg sa preniesie 3,0 ml základného štandardného roztoku (3.9.1) do 250 ml Erlenmeyerovej banky. Roztok sa odparí na objem cca 0,5 ml prúdom dusíka. Pridá sa 15 g slepej vzorky, premieša a počká 10 minút pred extrakciou. (5.2)

*Poznámka:* pre účely tejto metódy, slepá vzorka musí byť druhovo podobná vzorke a pri analýze nesmie byť zistený robenidín.

### 5.2. Extrakcia

S presnosťou na 0,01 g sa naváži približne 15 g pripravenej vzorky. Prenesie sa do 250 ml Erlenmeyerovej banky a pridá sa 100,0 ml okysleného metanolu (3.2), zazátkuje sa a trepe jednu hodinu v trepačke (4.2). Roztok sa prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami (4.5) a celý filtrát sa zachytí do 150 ml Erlenmeyerovej banky. Pridá sa 7,5 g molekulového sita (3.4), zazátkuje sa a trepe päť minút. Okamžite sa prefiltruje cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Tento roztok sa ponechá na čistenie (5.3).

### 5.3. Prečisťovanie

#### 5.3.1. Príprava kolóny s oxidom hlinitým

Na dno sklenej kolóny (4.1) sa vloží malá zátko zo sklenenej vaty a utlačí sa pomocou sklenenej tyčinky. Naváži sa 11,0 g pripraveného oxidu hlinitého (3.5) a prenesie sa na kolónu. Musí sa dbať nato, aby vystavenie účinkom atmosféry počas tohoto kroku bolo minimálne. Jemne sa klepne na naplnenú kolónu v jej spodnej časti tak, aby sa oxid hlinitý usadil.

#### 5.3.2. Prečistenie vzorky

Napipetuje sa 5,0 ml extraktu vzorky pripravenej podľa (5.2) a nanesie na kolónu. Hrot pipety sa oprie tesne o stenu kolóny a roztok sa nechá vsiaknuť do oxidu hlinitého. Robenidín sa vymýva z kolóny použitím 100 ml metanolu (3.1), pri rýchlosti prietoku 2 – 3 ml/minútu a eluát sa zachytáva do 250 ml banky s guľatým dnom. Roztok metanolu sa odparí do sucha pri zníženom tlaku pri teplote 40°C pomocou rotačnej vákuovej odparky (4.3). Odparok sa rozpustí v 3 – 4 ml mobilnej fázy (3.8) a kvantitatívne prenesie do 10 ml odmernej banky. Banka sa vypláchne niekoľkými 1 až 2 ml dávkami mobilnej fázy a tieto vyplachovacie roztoky sa prenesú do odmernej banky. Doplní sa po značku tým istým rozpúšťadlom a premieša. Alikvotná časť sa potom prefiltruje cez membránový filter 0,45 µm (4.7). Tento roztok sa použije na HPLC stanovenie (5.4)

### 5.4. HPLC stanovenie

#### 5.4.1. Parametre

Ponúknuté sú nasledujúce podmienky; je možné použiť iné podmienky za predpokladu, že poskytnú ekvivalentné výsledky:

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.4.1)

Mobilná fáza HPLC (3.8)

Prietok 1,5 až 2 ml/minútu

Vlnová dĺžka detektora 317 nm

Objem nástreku 20 až 50 µl

Stabilita chromatografického systému sa skontroluje tým, že sa nastrekne niekoľkokrát kalibračný roztok (3.9.3) obsahujúci 3,6 mg/ml, dovtedy kým sa nedosiahne konštantná výška píkovo a konštantné retenčné časy.

#### 5.4.2. Kalibračná krivka

Nastrekne sa každý kalibračný roztok (3.9.3) niekoľkokrát a zmeria sa výška (plocha) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku použitím priemerných výšok alebo plôch píkovo kalibračných roztokovo na ordínátu a zodpovedajúce koncentrácie v mg/ml na abscisu.

#### 5.4.3. Roztok vzorky

Extrakt vzorky (5.3.2) sa niekoľkokrát nastrekne s použitím rovnakého objemu aký ste použili na kalibračné roztoky a stanovte priemernú výšku (plochu) píku pre píky robenidínu.

### 6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píkovo robenidínu v roztoku vzorky sa stanoví koncentrácia roztoku vzorky v mg/ml s použitím kalibračného grafu (5.4.2).

Obsah robenidínu w (mg/kg) vo vzorke sa vypočíta nasledovným vzorcom:

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

v ktorom je:

c = koncentrácia robenidínu v roztoku vzorky v mg/ml,

m = hmotnosť vzorky v gramoch.

### 7. Validácia výsledkov

#### 7.1. Identita

Identita stanovovanej látky sa dá potvrdiť následnou chromatografiou, alebo použitím detektora pomocou ktorého sa porovnajú spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.9.3) obsahujúceho 6 µg/ml.

## 7.1.1. Následná chromatografia

Extrakt vzorky sa obohatí pridaním príslušného množstva kalibračného roztoku (3.9.3). Množstvo pridaného robenidínu musí byť podobné ako predpokladané množstvo robenidínu zistené v extrakte vzorky.

Výšku píku robenidínu sa musí zvýšiť ak sa zoberú do úvahy pridané množstvo a zriedenie extraktu. Šírka píku v polovici jeho maximálnej výšky musí tvoriť približne 10 % pôvodnej šírky.

## 7.1.2. Detekcia

Výsledky sa vyhodnotia v súlade s nasledovnými kritériami:

- vlnová dĺžka maximálnej absorpcie vzorky a štandardného spektra, zaznamenaná na vrchole píku na chromatograme, musí byť rovnaká v rozmedzí stanovenom rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie je typickou hodnotou približne 2 nm
- medzi 250 až 400 nm, sa spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku na chromatograme nesmú líšiť pre tieto časti spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium bude splnené vtedy, ak sa objavia rovnaké maximá a keď v žiadnom pozorovanom bode neprekročí odchýlka medzi dvoma spektrami 15 % absorpcie štandardu stanovovanej látky
- medzi 250 až 400 nm, spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky sa nesmú líšiť pre tieto časti spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium bude splnené vtedy, ak sa objavia rovnaké maximá a keď vo všetkých zistených bodoch neprekročí odchýlka medzi dvoma spektrami 15 % absorpcie spektra vrcholu píku

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak prítomnosť analyzovanej látky sa nepotvrdila.

## 7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení tej istej vzorky nesmie prekročiť 10 % relatívnych z vyššej hodnoty výsledku v prípade obsahu robenidínu vyššieho ako 15 mg/kg.

## 7.3. Návratnosť

V prípade slepej vzorky do ktorej bol pridaný robenidín musí byť návratnosť najmenej 85 %.

## 8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie

Spoločnú štúdiu zorganizovalo spoločenstvo v rámci ktorej dvanásť laboratórií analyzovalo štyri vzorky krmiva pre hydinu a králiky, sypké alebo granulované. Z každej vzorky sa vykonali duplicitné analýzy. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

	Hydina		Králik	
	sypké krmivo	granule	sypké krmivo	granule
Priemer mg/kg	27,00	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
Návratnosť (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

$S_r$  = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

$CV_r$  = variačný koeficient opakovateľnosti

$S_R$  = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

$CV_R$  = variačný koeficient reprodukovateľnosti

## 2. STANOVENIE METYLBENZOQUATU

### 7-benzyloxy-6-butyl-3-metoxycarbonyl-4chinolín

#### 1. Predmet metódy

Táto metóda je určená na stanovenie methylbenzoquatu v krmivách. Dolná medza stanoviteľnosti je 1 mg/kg.

#### 2. Podstata metódy

Methylbenzoquat sa extrahuje zo vzorky metanolovým roztokom kyseliny metánsulfónovej. Extrakt sa prečistí dichlórmetánom, s použitím iónovo-výmennej chromatografie a potom znovu dichlórmetánom. Obsah metylbenzoquatu sa stanoví pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie s reverznými fázami (HPLC) a použitím UV detektora.

#### 3. Chemikálie

##### 3.1. Dichlórmetán

##### 3.2. Metanol, čistoty HPLC

##### 3.3. Mobilná fáza pre HPLC

zmes metanolu (3.2) a vody (čistoty HPLC) 75 + 25 (v + v),

prefiltruje sa cez 0,22 µm filter (4.5) a roztok sa odplyní (t. j. vystavením účinkom ultrazvuku po dobu 10 minút).

##### 3.4. Roztok kyseliny metánsulfónovej, $\sigma = 2\%$

zriedíte 20,0 ml kyseliny metánsulfónovej metanolom na 1 000 ml (3.2).

##### 3.5. Roztok kyseliny chlorovodíkovej, $\sigma = 10\%$

100 ml kyseliny chlorovodíkovej sa zriedi ( $P_{20}$  c. 1,18 g/ml) vodou na 1 000 ml.

##### 3.6. Katexová živica Amberlite-CG 120 (Na), 110 až 200 siete

Živicu treba pred použitím upraviť: zo 100 g živice sa pripraví suspenzia v 500 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.5) a za stáleho miešania chýba AT sa privedie do varu zahrievaním na horúcej platni. Nechá sa vychladnúť a kyselina sa dekantuje. Prefiltruje sa cez filtračný papier za zníženého tlaku. Živica sa premyje dvakrát 500 ml dávkami vody a potom 250 ml metanolu (3.2). Živica sa opláchne v ďalšou 250 ml dávkou metanolu a vysuší prúdením vzduchu cez filtračný koláč. Vysušená živica sa skladuje v zazátkovanej banke.

##### 3.7. Štandardná látka: čistý metylbenzoquat (7-benzyloxy-6-butyl-3-metoxycarbonyl-4-chinolín)

###### 3.7.1. Základný štandardný roztok metylbenzoquatu, 500 µg/ml

S presnosťou na 0,1 mg sa naváži 50 mg štandardu (3.7), rozpustí v roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) v 100 ml odmernej banke, doplní po značku a premieša.

###### 3.7.2. Pracovný štandardný roztok metylbenzoquatu, 50 µg/ml

Do 50 ml odmernej banky sa napipetuje 5,0 ml základného štandardného roztoku metylbenzoquatu (3.7.1), doplní sa po značku metanolom (3.2) a zmieša.

###### 3.7.3. Kalibračné roztoky

Do sady 25 ml odmerných baniek sanapipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml pracovného štandardného roztoku metylbenzoquatu (3.7.2). Doplní sa po značku mobilnou fázou (3.3) a zmieša. Tieto roztoky majú koncentrácie 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, resp. 10,0 µg/ml metylbenzoquatu. Tieto roztoky musia byť čerstvo pripravené pred použitím.

#### 4. Prístroje

##### 4.1. Laboratórna trepačka

- 4.2. Rotačná vákuová odparka
- 4.3. Sklenená kolóna (250 mm x 15 mm) s uzatváracím kohútom a zásobníkom s obsahom približne 200 ml
- 4.4. HPLC prístroj s ultrafialovým detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s diódovým detektorom.
  - 4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu 300 mm x 4 mm, C-18,10 µm náplň alebo ekvivalentná
- 4.5. Membránové filtre, 0,22 µm
- 4.5. Membránové filtre, 0,4 µm

## 5. Pracovný postup

### 5.1. Všeobecne

- 5.1.1. Musí sa vykonať analýza slepej vzorky, s cieľom skontrolovať, že vo vzorke nie je prítomný metylbenzoquate a ani interferujúce látky.
- 5.1.2. Skúška návratnosti sa musí vykonať analyzovaním krmiva bez robenidínu – slepej vzorky robenidínu. Skúška návratnosti sa musí vykonať analyzovaním krmiva bez metylbenzoquatu – slepej vzorky (5.1.1.), ktorý sa obohatí prídavkom takého množstva metylbenzoquatu, ktoré je podobné množstvu prítomnému vo vzorke. S cieľom obohatenia na úrovni 15 mg/kg sa pridá 600 µl základného štandardného roztoku (3.7.1) k 20 g slepej vzorky, premieša sa a pred extrakciou (5.2) tak sa počká 10 minút.

*Poznámka:* pre účely tejto metódy, slepá vzorka musí byť druhovo podobná vzorke a pri analýze nesmie byť zistený benzoquat.

### 5.2. Extrakcia

S presnosťou na 0,01 g sa naváži približne 20 g pripravenej vzorky a prenesie do 250 ml Erlenmeyerovej banky. Pridá sa 100,0 ml roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) a mechanicky trepe (4.1) 30 minút. Roztok sa prefiltruje cez filtračný papier, filtrát sa zachytí a použije pri extrakcii kvapalina-kvapalina (5.3)

### 5.3. Extrakcii kvapalina-kvapalina

25,0 ml filtrátu získaného podľa (5.2) sa prenesie do 500 ml oddeľovacieho lievika obsahujúceho 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.5) do lievika sa pridá 100 ml dichlórmetánu (3.1) a trepe jednu minútu. Vrstvy sa nechajú oddeliť a spodná vrstva (dichlórmetán) sa vypustí do 500 ml banky s guľatým dnom. Extrakcia vodnej fázy sa zopakuje s dvomi ďalšími 40 ml dávkami dichlórmetánu a extrakty sa spoja v banke s guľatým dnom s prvým extraktom. Extrakt dichlórmetánu sa odparí dosucha na rotačnej odparke (4.2) pracujúcej pri zníženom tlaku pri teplote 40 °C. Zvyšok sa rozpustí v 20 až 25 ml metanolu (3.2), banka sa zazátkuje a celé množstvo extraktu sa odloží a použije na iónovo- výmennú chromatografiu (5.4)

### 5.4. Iónovo-výmenná chromatografia

#### 5.4.1. Príprava katexovej kolóny

Do spodnej časti sklenenej kolóny (4.3) sa vloží zátko zo sklenenej vaty. Pripraví sa suspenzia 5,0 g upravenej katexovej živice (3.6) a 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.5), naleje sa do sklenenej kolóny a nechá sa usadiť. Prebytočná kyselina sa vypustí na úroveň tesne nad povrchom živice a kolóna sa premýva vodou, až kým filtrát nebude neutrálny na lakmus. 50 ml metanolu (3.2) sa naniesie na kolónu a nechá sa stiecť k povrchu živice.

#### 5.4.2. Stĺpcová chromatografia

Pomocou pipety sa opatrne prenesie získaný extrakt (5.3) na kolónu. Banka s guľatým dnom sa vypláchne dvoma dávkami 5 až 10 ml metanolu (3.2) a tieto roztoky sa prenesú na kolónu. Extrakt sa nechá stiecť k povrchu živice a kolóna sa premýje 50 ml metanolu tak, aby sa zabezpečilo, že prietok nepresiahne hodnotu 5 ml za minútu. Vytekajúci roztok vylejte. Etyl benzoquat sa z kolóny vymýva 150 ml roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) a eluat z kolóny sa zachytí do 250 ml Erlenmeyerovej banky.

### 5.5. Extrakcia kvapalina-kvapalina

Eluát získaný podľa (5.4.2) sa preniesie do oddeľovacieho lievika o objeme 1 liter. Erlenmeyerová banka sa prepláchnie 5 – 10 ml metanolu (3.2) a roztoky sa spoja s obsahom oddeľovacieho lievika. Pridá sa 300 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.5) a 130 ml dichlórmetánu (3.1). Trepe sa jednu minútu, a fázy sa nechajú oddeliť. Spodnú vrstvu (dichlórmetán) sa vypustí do 500 ml banky s guľatým dnom. Extrakciu vodnej fázy sa zopakuje s dvomi ďalšími 40 ml dávkami dichlórmetánu a extrakty sa spoja v banke s guľatým okrúhlym dnom s prvým extraktom.

Dichlórmetánový extrakt sa odparí dosucha na rotačnej odparke (4.2) pracujúcej pri zníženom tlaku pri teplote 40 °C, zvyšok sa rozpustí v banke s približne 5 ml metanolu (3.2) a tento roztok sa preniesie kvantitatívne do 10 ml odmernej banky. Banku s okrúhlym dnom sa vypláchnie ďalšími dvomi dávkami 1 až 2 ml metanolu a tieto roztoky sa preniesú do odmernej banky. Doplní sa po značku metanolom a premieša alikvotná časť sa prefiltruje cez membránový filter (4.6). Odložte tento roztok k HPLC stanoveniu (5.6).

### 5.6. HPLC stanovenie

#### 5.6.1. Parametre

Ponúknuté sú nasledujúce podmienky; je možné použiť iné podmienky za predpokladu, že poskytnú ekvivalentné výsledky:

- Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.4.1),
- Mobilná fáza pre HPLC zmes metanol-voda (3.3),
- prietok 1 až 1,5 ml/minútu
- vlnová dĺžka detekcie: 265 nm
- Objem nástreku 20 až 50 µl

Stabilita chromatografického systému sa skontroluje, tým, že sa nastreknete niekoľkokrát kalibračný roztok (3.7.3) obsahujúci 4 µg/ml, dovtedy kým sa nedosiahnu konštantné výšky alebo plochy píkovo a konštantné retenčné časy.

#### 5.6.2. Kalibračná krivka

Nastrekne sa každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a zmerajú sa výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojí sa kalibračná krivka s použitím priemerných výšok alebo plôch píkovo kalibračných roztokovo na ordinátu a príslušné koncentrácie v µg/ml na abscisu.

#### 5.6.3. Roztok vzorky

Extrakt vzorky (5.5) sa niekoľkokrát nastrekne s použitím rovnakého objemu aký sa použil na kalibračné roztoky a stanoví sa strednú výšku (plochu) píku pre píky metyl benzoquatu.

## 6. Výpočet výsledkov

Stanoví sa koncentrácia roztoku vzorky v µg/ml z priemernej výšky (plochy) píkovo metylbenzoquate v roztoku vzorky s použitím kalibračného grafu (5.6.2).

Obsah metylbenzoquatu w (mg/kg) vo vzorke je daný nasledovným vzorcom:

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

v ktorom je:

c = koncentrácia metylbenzoquatu v roztoku vzorky v µg/ml,

m = navážka vzorky v gramoch.

## 7. Validácia výsledkov

### 7.1. Identita

Identita stanovovanej látky sa dá potvrdiť následnou chromatografiou, alebo použitím detektora pomocou ktorého sa porovnajú spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.7.3) obsahujúceho 10 µg/ml.



## 7.1.1. Následná chromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá príslušné množstvo pracovného štandardného roztoku s faktorom (3.7.2). Množstvo pridaného metylbenzoquatu musí byť podobné ako predpokladané množstvo metylbenzoquatu v extrakte vzorky, iba výška píku metylbenzoquatu sa musí zvýšiť ak sa zoberie do úvahy pridané množstvo a zriedenie extraktu. Šírka píku v polovici jeho maximálnej výšky musí tvoriť približne 10 % pôvodnej šírky,

## 7.1.2. Detekcia

## 7.1.2. Výsledky sa vyhodnotia v súlade s nasledovnými kritériami:

- a) vlnová dĺžka maximálnej absorpcie vzorky a štandardného spektra, zaznamenaná na vrchole píku na chromatograme, musí byť rovnaká v rozmedzí stanovenom rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie je typickou hodnotou približne 2 nm.
- b) medzi 220 až 350 nm, sa spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku na chromatograme nesmú líšiť pre tieto časti spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium bude splnené vtedy, ak sa objavia rovnaké maximá a keď v žiadnom pozorovanom bode neprekročí odchýlka medzi dvoma spektrami 15 % absorpcie štandardnej analyzovanej látky.
- c) medzi 220 až 350 nm, spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky sa nesmú líšiť pre tieto časti spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium bude splnené vtedy, ak sa objavia rovnaké maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch neprekročí odchýlka medzi dvoma spektrami 15 % absorpcie spektra vrcholu.
- c) Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak prítomnosť analyzovanej látky sa nepotvrdila.

## 7.2. Opakovateľnosť

- 7.2. Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie prekročiť: 10 % relatívnych vzhľadom na vyšší výsledok pre obsahy metylbenzoquatu od 4 a 20 mg/kg.

## 7.3. Návratnosť

- 7.3. V prípade obohatenej slepej vzorky musí byť návratnosť najmenej 90 %.

## 8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie.

## 8. Päť vzoriek bolo analyzovaných v 10 laboratóriách. V každej vzorke sa vykonali duplicitné analýzy.

## Výsledky

	slepý pokus	sypké krmivo 1	granule 1	sypké krmivo 2	granule 2
priemer mg/kg	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
$S_r$ (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	8,50
$CV_r$ (%)	—	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
návratnosť (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d. = nezistené

$S_r$  = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

$CV_r$  = variačný koeficient opakovateľnosti

$S_R$  = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

$CV_R$  = variačný koeficient reprodukovateľnosti