

31993L0117

L 329/54

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

30.12.1993

**DWUNASTA DYREKTYWA KOMISJI 93/117/WE****z dnia 17 grudnia 1993 r.****ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

Artykuł 2

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r., w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy dla urzędowej kontroli pasz <sup>(1)</sup>, ostatnio zmieniona rozporządzeniem (EWG) nr 3768/85 <sup>(2)</sup>, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa 70/373/EWG wymaga, aby urzędowe kontrole pasz były przeprowadzane przy użyciu wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy w celu sprawdzania zgodności z wymaganiami, wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

powinny być ustanowione wspólnotowe metody analizy zachowywania warunków stosowania w paszach zwierzęcych takich dodatków paszowych jak robenidyna i benzokwat metylu;

środki, przewidziane w niniejszej dyrektywie, są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

## Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, aby analizy przeprowadzone w ramach urzędowej kontroli celem stwierdzenia zawartości robenidyny i benzokwatu metylu były przeprowadzane z wykorzystaniem metod opisanych w załączniku do niniejszej dyrektywy.

Państwa Członkowskie wprowadzają w życie, najpóźniej do dnia 30 listopada 1994 r., przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do dostosowania się do przepisów niniejszej dyrektywy oraz niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Państwa Członkowskie przyjmując te przepisy, zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Procedurę dokonywania takich odniesień określają Państwa Członkowskie.

## Artykuł 3

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

Sporządzono w Brukseli, dnia 17 grudnia 1993 r.

W imieniu Komisji

René STEICHEN

Członek Komisji

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

<sup>(2)</sup> Dz.U. L 362 z 31.12.1985, str. 8.

## ZAŁĄCZNIK

## 1. OZNACZANIE ROBENIDYNY

## chlorowodorek 1,3 di[(4-chlorobenzylideno) amino] guanidyny

## 1. Cel i zakres

Niniejsza metoda ma na celu oznaczanie robenidyny w paszach, przy czym najniższy poziom oznaczenia wynosi 5 mg/kg.

## 2. Zasada

Próbka jest ekstrahowana zakwaszonym metanolem. Ekstrakt jest wysuszany i podwielokrotna część próbki jest poddawana czyszczeniu w kolumnie z tlenkiem glinu. Robenidyna jest wypłukiwana z kolumny metanolem, stężana i gromadzona w odpowiedniej ilości w fazie ruchomej. Zawartość robenidyny oznaczana jest przy użyciu wysokiej wydajności chromatografii cieczowej (HPLC), z odwróconymi fazami, przy pomocy detektora promieniowania UV.

## 3. Odczynniki

## 3.1. Metanol

## 3.2. Zakwaszony metanol

Wlać 4.0 ml kwasu solnego ( $P_{20C}$ , 1,18 g/ml) do 500 ml do szklanej kolby miarowej, uzupełnić aż do oznaczenia metanolem (3.1) i wymieszać. Roztwór ten powinien zostać przygotowany tuż przed użyciem.

## 3.3. Acetonitryl, klasa chromatografii ekstrakcyjnej

## 3.4. Sito molekularne

Typ 3A, 8–12 zgrubień oczek (zgrubienia 1,6–2,5 mm, krystaliczny glinokrzemian, średnica porów 0.3 mm)

## 3.5. Tlenek glinu: klasa aktywności 1 dla chromatografii kolumnowej

Przenieść 100 g tlenku glinu do odpowiedniego pojemnika i dodać 2 ml wody. Zatkać pojemnik i potrząsać przez około 20 minut. Przechowywać w dobrze zamkniętym pojemniku.

3.6. Roztwór diwodorofosforanu potasu,  $c = 0,025$  mola/l

Rozpuścić 3,4 g diwodorofosforanu potasu w wodzie (HPLC) w 1 000 ml szklanej kolbie miarowej, uzupełnić do oznaczenia i wymieszać.

3.7. Roztwór wodorofosforanu disodu  $c = 0,025$  mola/l

Rozpuścić 3,55 g bezwodnego (lub 4,45 g dihydratu lub 8,95 g dodekahydratu) wodorofosforanu disodu w wodzie (klasy HPLC) w 1 000 ml szklanej kolbie miarowej, uzupełnić do oznaczenia i wymieszać.

## 3.8. Faza ruchoma chromatografii cieczowej (HPLC)

Wymieszać razem następujące odczynniki:

650 ml acetonitrylu (3.3),

250 ml wody (klasy HPLC),

50 ml roztworu diwodorofosforanu potasu (3.6),

50 ml roztworu wodorofosforanu disodu (3.7).

Przefiltrować przez 0,22  $\mu$ m filtr (4.6), odgazować roztwór (np. przy pomocy ultradźwięków przez 10 minut).

## 3.9. Substancja wzorcowa

Czysta robenidyna: chlorowodorek 1,3 di[(4-chlorobenzylideno) amino] guanidyny, E 750.

3.9.1. Podstawowy wzorcowy roztwór robenidyny: 300 µg/ml:

Odważyć z dokładności do 0,1 mg, 30 mg wzorcowej substancji robenidyny (3.9). Rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.2) w 100 ml szklanej kolbie miarowej, uzupełnić do oznaczenia tym samym rozpuszczalnikiem i wymieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.2. Pośredni wzorcowy roztwór robenidyny: 12 µg/ml

Przenieść 10,0 ml wzorcowego roztworu podstawowego (3.9.1) do 250 ml kolby miarowej, uzupełnić do oznaczenia fazą ruchomą (3.8) i wymieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.3. Roztwory do wzorcowania

Do szeregu 50 ml wzorcowych kolb przenieść 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml pośredniego roztworu wzorcowego (3.9.2). Uzupełnić do oznaczenia fazą ruchomą (3.8) i wymieszać. Otrzymane roztwory odpowiadają 1,2, 2,4, 3,6 oraz 6 µg/ml robenidyny odpowiednio. Roztwory te muszą być przygotowane tuż przed użyciem.

4. **Aparatura**

4.1. Szklana kolumna

Wytworzona z bursztynowego szkła z kurkiem zamykającym i zbiornikiem o pojemności około 150 ml, wewnętrznej średnicy 10–15 mm, długości 250 mm.

4.2. Laboratoryjna wstrząsarka ręczna

4.3. Obrotowy warstwowy aparat wypamy

4.4. Sprzęt do chromatografii cieczowej z detektorem promieniowania UV lub detektor z układem diod pracujący w zakresie 250–400 nm

4.4.1. Cieczowa kolumna chromatograficzna: 300 mm x 4 mm, C<sub>18</sub> 10 µm opakowanie lub równoważne.

4.5. Bibuła filtracyjna z włókna szklanego (Whatman GF/A lub równoważne).

4.6. Filtry membranowe 0,22 µm

4.7. Filtry membranowe 0,45 µm

5. **Procedura**

*Uwaga:* Robenidyna jest wrażliwa na światło. Należy używać szkła bursztynowego we wszystkich działaniach.

5.1. Uwagi ogólne

5.1.1. Ślepa próba powinna być przeanalizowana celem potwierdzenia, że ani robenidyna ani inne substancje przeszkadzające nie występują w roztworze.

5.1.2. Badanie odzysku przeprowadza się przez analizę paszy próbnej (5.1.1), który został wzmocniony poprzez dodanie pewnej ilości robenidyny, podobnej do ilości znajdującej się w próbce. Aby uzyskać wzmocnienie do poziomu 60 mg/kg, przenieść 3,0 ml wzorcowego roztworu podstawowego (3.9.1) do 250 ml stożkowej kolby. Odparować roztwór do około 0,5 ml w strumieniu azotu. Dodać 15 g paszy używana w ślepej próbie, wymieszać i odczekać 10 minut przed przystąpieniem do ekstrakcji (5.2).

*Uwaga:* do celów niniejszej metody, pasza używana w ślepej próbie powinna być podobna pod względem rodzaju do tej z badanej próbki i w czasie analizy nie powinno dojść do wykrycia robenidyny.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć z dokładnością do 0,01 g około 15 g przygotowanej do badania próbki. Przenieść ją do 250 ml stożkowej kolby i dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.2), zatkać korkiem i potrząsać przez godzinę przy użyciu wstrząsarki (4.2). Roztwór odfiltrować przez bibułę filtracyjną z włókna szklanego (4.5), a cały filtrat zebrać w kolbie stożkowej o pojemności 150 ml. Dodać 7,5 g sita molekularnego (3.4), zatkać korkiem i potrząsać przez pięć minut. Natychmiast po zakończeniu przefiltrować przez bibułę filtracyjną z włókna szklanego. Roztwór ten utrzymać do oczyszczania (5.3).

### 5.3. Oczyszczanie

#### 5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu

Małą zatyczkę z waty szklanej włożyć do dolnego końca kolumny szklanej (4.1) i ubić ją szklaną pałeczką. Odważyć 11,0 g przygotowanego tlenku glinu (3.5) i przenieść do kolumny. Należy zwrócić uwagę, aby w czasie wykonywania tej czynności zminimalizować narażenie na działanie powietrza atmosferycznego. Delikatnie postukać napełnioną kolumnę od dolnej strony w celu osadzenia tlenku glinu.

#### 5.3.2. Oczyszczanie próbki

Przy pomocy pipety przenieść do kolumny 5,0 ml ekstraktu próbki przygotowanego zgodnie z (5.2). Zakończenie pipety przyłożyć blisko do ścianki kolumny i pozwolić, aby roztwór został wchłonięty przez tlenek glinowy. Wypłukać robenidynę z kolumny przy użyciu 100 ml metanolu (3.1), przy szybkości przepływu 2–3 ml na minutę, a eluat zebrać w 250 ml kolbie kulistej. Roztwór metanolu odparować do suchości przy obniżonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C, przy pomocy warstwowego aparatu wyparowego (4.3). Należy ponownie rozpuścić pozostałość w 3–4 ml fazy ruchomej (3.8) i przekazać ilościowo do szklanej kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę przepłukać kilkoma 1–2 ml porcjami fazy ruchomej i wylać popłuczyny do szklanej kolby miarowej. Dopełnić tego samego rozpuszczalnika do oznaczenia i wymieszać. Podwielokrotną część próbki jest filtrowana przez filtr 0,45 µm (4.7). Zachować ten roztwór do oznaczenia HPLC (5.4).

### 5.4. Oznaczanie HPLC

#### 5.4.1. Parametry

Następujące podane są jako wytyczne, inne warunki mogą być wykorzystane pod warunkiem, że dają równoważne wyniki:

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1),

Faza ruchoma HPLC (3.8),

Szybkość przepływu: 1,5–2 ml na minutę,

Długość fali detektora: 317 nm,

Objętość iniekcji: 20–50 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dokonać kilkukrotnej iniekcji roztworu wzorcowego (3.9.3), zawierającego 3,6 µg/ml, aż zostaną osiągnięte stałe wartości szczytowe i czasy retencji.

#### 5.4.2. Wykres wzorcowy

Wstrzyknąć każdy roztwór wzorcowy (3.9.3), kilka razy zmierzyć wartości szczytowe (obszary) dla każdego stężenia. Następnie należy nakreślić krzywą odwzorowania wykorzystując średnie wartości szczytowe lub obszary roztworów wzorcowych na osi rzędnych wraz z odpowiadającymi stężeniami w µg na ml na osi odciętych.

#### 5.4.3. Roztwór próbny

Próbny ekstrakt (5.3.2) wstrzyknąć kilka razy, używając takiej samej objętości jak w przypadku roztworów wzorcowych, i ustalić średnią wartość szczytową (obszar) robenidyny.

### 6. Obliczanie wyników

Na podstawie średnich wysokości (obszarów) robenidyny roztworu próbnego, ustala się stężenie roztworu próbnego w µg/ml przez odniesienie do wykresu wzorcowego (5.4.2).

Zawartość robenidyny w (mg/kg) w próbce oblicza się przy pomocy następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie robenidyny w roztworze próbnym w µg/ml,

m = masa badanej próbki w gramach.

### 7. Weryfikacja wyników

#### 7.1. Tożsamość

Tożsamość składnika oznaczanego (analitu) może być potwierdzona przy pomocy współchromatografii lub przy użyciu detektora z układem diod, przy pomocy którego, zakresy ekstraktu próbnego i roztworu wzorcowego (3.9.3), zawierające 6 µg/ml są porównywane.

## 7.1.1. Współchromatografia

Próbny ekstrakt jest wzmocniony przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu wzorcowego (3.9.3). Ilość dodanej robenidyny powinna być podobna do oszacowanej ilości robenidyny odkrytej w ekstrakcie próbnym.

Tylko wysokość szczytowej wartości robenidyny powinna zostać podwyższona po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość wartości szczytowej, stanowiąca połowę maksymalnej wysokości, musi mieścić się w około 10 % szerokości pierwotnej.

## 7.1.2. Detektor z zestawem diod

Wyniki są oceniane według następujących kryteriów:

- długość fali maksymalnego pochłaniania próbki i widm wzorcowych, zapisane na szczytowym wierzchołku chromatogramu, musi być taka sama w ramach marginesu określonego przez zdolność rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detektora z zestawem diod wynosi ona zazwyczaj około 2 nm;
- między 250 a 400 nm, próbka i wzorcowe widma zapisane na szczytowym wierzchołku chromatogramu, nie mogą różnić się dla tych części widma w zakresie 10–100 % względnej absorpcji. Kryterium to jest spełnione, kiedy występują takie same wartości maksymalne i przy żadnym zaobserwowanym punkcie rozbieżność między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji wzorcowego anlitu;
- między 250 a 400 nm, widma rosnących, szczytowych i malejących wartości szczytowych tego ekstraktu próbnego nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie 10–100 % względnej absorpcji. Kryterium to jest spełnione, kiedy występują takie same maksymalne wartości i w ramach żadnego zaobserwowanego punktu, rozbieżność między widmami nie przekracza 15 % absorpcji widma punktu szczytowego;

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione to obecność analitu nie została potwierdzona.

## 7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % wyższego wyniku dla zawartości robenidyny powyżej 15 mg/kg.

## 7.3. Odzysk

Dla wzmocnionej ślepej próbki odzysk powinien wynosić przynajmniej 85 %.

## 8. Wyniki wspólnie prowadzonych badań

Wspólnota zorganizowała wspólne badania w ramach których, cztery próbki paszy dla drobiu i królików, w postaci mączki lub granulatu zostały poddane analizie przez 12 laboratoriów. Każdą próbkę poddano podwójnej analizie. Wyniki zostały podane w tabeli poniżej.

|                       | Pasza dla drobiu |          | Pasza dla królików |          |
|-----------------------|------------------|----------|--------------------|----------|
|                       | Mączka           | Granulat | Mączka             | Granulat |
| Wartość średnia mg/kg | 27,00            | 27,99    | 43,6               | 40,1     |
| Sr (mg/kg)            | 1,46             | 1,26     | 1,44               | 1,66     |
| CVr (%)               | 5,4              | 4,5      | 3,3                | 4,1      |
| Sr (mg/kg)            | 4,36             | 3,36     | 4,61               | 3,91     |
| CVR (%)               | 16,1             | 12,0     | 10,6               | 9,7      |
| Odzysk (%)            | 90,0             | 93,3     | 87,2               | 80,2     |

Sr = odchylenie standardowe powtarzalności.

CVr = współczynnik zmienności powtarzalności.

SR = odchylenie standardowe odtwarzalności.

CVR = współczynnik zmienności odtwarzalności.

## 2. OZNACZANIE BENZOKWATU METYLU

### 7-benzylloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon

#### 1. Cel i zakres

Niniejsza metoda oznaczania zawartości benzokwatu metylu w paszach. Najniższy poziom oznaczenia wynosi 1 mg/kg.

#### 2. Zasada

Benzokwat metylu ekstrahowany jest z roztworem metanolowego kwasu metanosulfonowego. Ekstrakt jest oczyszczany dichlorometanem, przy użyciu chromatografii jonowymienna, a potem ponownie dichlorometanem. Zawartość benzokwatu metylu jest oznaczana przy użyciu wysokiej wydajności chromatografii cieczowej (HPLC), z odwróconymi fazami, przy pomocy detektora promieniowania UV.

#### 3. Odczynniki

##### 3.1. Dichlorometan

##### 3.2. Metanol, klasa chromatografii cieczowej (HPLC)

##### 3.3. Faza ruchoma chromatografii cieczowej:

mieszanina metanolu (3.2) i wody (klasy HPLC) 75 + 25 (objętościowo + objętościowo).

Przefiltrować przez filtr 0,22  $\mu\text{m}$  (4.5), odgazować roztwór (np. przy pomocy ultradźwięków przez 10 minut).

##### 3.4. Roztwór kwasu metanosulfonowego $\sigma = 2 \%$

Rozcieńczyć 20,0 ml kwasu metanosulfonowego przy pomocy metanolu (3.2) do objętości 1 000 ml.

##### 3.5. Roztwór kwasu solnego $\sigma = 10 \%$

Rozcieńczyć 100 ml kwasu solnego ( $P_{20}$  stężenie 1,18 g/ml) wodą do objętości 1 000 ml.

##### 3.6. Żywica kationitowa Amberlite CG - 120 (Na), wielkość oczka 100–200

Żywica jest wstępnie oczyszczane przed użyciem: sporządzić zawiesinę 100 g żywicy i 500 ml roztworu kwasu solnego (3.5) i podgrzewać na płycie grzejnej aż do wrzenia, ciągle mieszając. Pozwolić na ostygnięcie i przelać kwas. Przefiltrować przez bibułę filtracyjną w próżni. Umyć żywicę dwukrotnie 500 ml porcjami wody, a następnie 250 ml metanolu (3.2). Przepłukać żywicę kolejną 250 ml porcją metanolu i wysuszyć dmuchając powietrzem na placek filtracyjny. Wysuszona żywicę przechowywać w zatkaanej butelce.

##### 3.7. Substancja wzorcowa: czysty benzokwat metylu (7 - benzoksylo - 6 - butylo - 3 - metoksykarbonylo - 4 chinolon)

##### 3.7.1. Podstawowy wzorcowy roztwór benzokwatu metylu: 500 $\mu\text{g/ml}$ .

Odważyć z dokładnością do 0,1 mg 50 mg wzorcowej substancji (3.7). Rozpuścić w roztworze kwasu metanosulfonowego (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do oznaczenia i wymieszać.

##### 3.7.2. Pośredni wzorcowy roztwór benzokwatu metylu: 50 $\mu\text{g/ml}$

Przenieść 5,0 ml wzorcowego roztworu podstawowego benzokwatu metylu (3.7.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do oznaczenia metanolem (3.2) i wymieszać.

##### 3.7.3. Roztwory wzorcowe

Do szeregu kolb miarowych o pojemności 25 ml przenieść 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml pośredniego wzorcowego roztworu benzokwatu metylu (3.7.2). Uzupełnić do oznaczenia fazą ruchomą (3.3) i wymieszać. Roztwory te mają stężenia odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 oraz 10,0  $\mu\text{g/ml}$  benzokwatu metylu. Roztwory muszą być przygotowane bezpośrednio przed użyciem.

#### 4. Aparatura

##### 4.1. Wstrząsarka laboratoryjna

- 4.2. Obrotowy warstwowy aparat wyparny
- 4.3. Szklana kolumna (250 mm x 15 mm) z kurkiem zamykającym i zbiornikiem o pojemności około 250 ml.
- 4.4. Sprzęt do chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem promieniowania UV o różnych długościach fal lub detektor z zespołem diod
  - 4.4.1. Cieczowa kolumna chromatograficzna: 300 mm x 4 mm, C - 18, 10 µm wypełnienie lub odpowiednik.
- 4.5. Filtry membranowe 0,22 µm
- 4.5. Filtry membranowe 0,45 µm

## 5. Procedura

### 5.1. Uwagi ogólne

- 5.1.1. Pasza użyta w ślepej próbie powinna być przeanalizowana w celu sprawdzenia obecności benzokwatu metylu bądź też substancji przeszkadzających.
- 5.1.2. Badanie odzysku powinno zostać przeprowadzone przez analizę paszy użytej w ślepej próbie, która została wzmocniona przez dodanie pewnej ilości benzokwatu metylu, podobnej do ilości obecnej w próbce. Aby wzmocnić do poziomu 15 mg/kg, dodać 600 µl wzorcowego roztworu podstawowego (3.7.1) do 20 g paszy użytej w ślepej próbie, wymieszać i odczekać 10 przed przystąpieniem do ekstrakcji(5.2).

*Uwaga:* do celów niniejszej metody, pasza używana w ślepej próbie powinna być podobna pod względem rodzaju do tej z próbki i w czasie analizy nie powinno dojść do wykrycia benzokwatu metylu.

### 5.2. Ekstrakcja

Odważyć z dokładnością do 0,01 g około 20 g przygotowanej próbki i przenieść ją do stożkowej kolby o pojemności 250 ml i dodać 100,0 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4), wstrząsać mechanicznie (4.1) przez 30 minut. Roztwór przefiltrować przez bibułę filtracyjną, a cały filtrat zachować dla etapu ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz (5.3).

### 5.3. Ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz

Do 500 ml lejka rozdzielczego, zawierającego 100 ml roztworu kwasu solnego (3.5) wlać 25,0 ml uzyskanego filtratu w (5.2). Dodać 100 ml dichlorometanu (3.1) do lejka i potrząsać przez minutę. Pozwolić na rozdzielenie warstw i niższą warstwę (dichlorometan) zlać do 500 ml kolby okrągłodennej. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej stosując kolejne dwie 40 ml porcje dichlorometanu i połączyć je z pierwszym ekstraktem w kolbie okrągłodennej. Ekstrakt dichlorometanu odparować do suchości na obrotowym aparacie wyparnym (4.2) działając w warunkach obniżonego ciśnienia, w temperaturze 40 °C. Pozostałość rozpuścić w 20–25 ml metanolu (3.2), zatkać kolbę i zachować całość ekstraktu dla chromatografii jonitowej (5.4).

### 5.4. Chromatografia jonowymienna

#### 5.4.1. Przygotowanie kolumny kationowej jonowymiennnej

Małą zatyczkę z waty szklanej włożyć do dolnego końca kolumny szklanej (4.3). Następnie przygotować zawiesinę, zawierającą 5,0 g oczyszczonej żywicy kationowymiennnej (3.6) i 50 ml kwasu solnego (3.5), i wlać do kolumny szklanej i poczekać aż się ustoi. Odlać nadmiar kwasu znad powierzchni żywicy i płukać kolumnę wodą dopóki papierek lakmusowy nie będzie pokazywać, że wyciek jest obojętny. Przenieść 50 ml metanolu (3.2) do kolumny i pozwolić, aby przesączył się do powierzchni żywicy.

#### 5.4.2. Chromatografia kolumnowa

Przy pomocy pipety ostrożnie przenieść do kolumny ekstrakt uzyskany zgodnie z opisem w (5.3). Kolbę okrągłodenną przepłukać dwoma porcjami 5–10 ml metanolu (3.2) i przelać popłuczyny do kolumny. Poczekać aż ekstrakt dojdzie do powierzchni żywicy, a następnie przepłukać kolumnę 50 ml metanolu, zapewniając, że szybkość przepływu nie przekracza 5 ml na minutę. Ścieki wylać. Benzokwat metylu wypłukać z kolumny przy użyciu 150 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4) i zebrać eluat w kolbie stożkowej o powierzchni 250 ml.

#### 5.5. Ekstrakcja w układzie ciecż–ciecż

Przenieść eluat uzyskany w (5.4.2) do lejka rozdzielczego o pojemności 1 litra.. Kolbę stożkową przepłukać 5–10 ml metanolu (3.2), a popłuczyny połączyć z zawartością lejka rozdzielczego. Dodać 300 ml roztworu kwasu solnego (3.5) i 130 ml dichlorometanu (3.1) i potrząsać przez minutę. Poczekać, aż fazy się rozdziela i niższą fazę (dichlorometan) zlać do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję z fazy wodnej, stosując kolejne dwie 70 ml porcje dwuchlorometanu i połączyć te ekstrakty z pierwszym w kolbie okrągłodennej.

Odparować ekstrakt dichlorometanu do suchości w obrotowym aparacie wyparnym (4.2) działając w warunkach obniżonego ciśnienia, w temperaturze 40 °C. Pozostałości należy rozpuścić w kolbie, zawierającej 5 ml metanolu (3.2) i jej zawartość przenieść do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę okrągłodenną przepłukać kolejnymi dwoma 1–2 ml porcjami metanolu i przelać popłuczyny do kolby miarowej. Dopełnić do oznaczenia metanolem i wymieszać. Podwielokrotna porcja jest filtrowana przez filtr membranowy (4.6). Zachować roztwór do oznaczania przy użyciu chromatografii cieczowej (HPLC) (5.6).

#### 5.6. Oznaczanie przy pomocy chromatografii cieczowej (HPLC)

##### 5.6.1. Parametry

Następujące warunki podawane są jako wytyczne, inne warunki mogą być wykorzystane pod warunkiem, że dają równoważne wyniki:

- kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1),
- faza ruchoma HPLC (3.3): mieszanina metanolu z wodą,
- szybkość przepływu: 1–1,5 ml na minutę,
- długość fali wykrywania: 265 nm,
- Objętość iniekcji: 20–50 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, wtryskując kilkakrotnie roztwór wzorcowy (3.7.3), zawierający 4 µg/ml, aż zostaną osiągnięte stałe wartości szczytowe i czasy retencji.

##### 5.6.2. Wykres wzorcowy

Każdy roztwór wzorcowy (3.7.3) wstrzyknąć kilka razy, oraz dokonać pomiarów wartości szczytowych (obszarów) dla każdego stężenia. Narysować wykres wzorcowy wykorzystując średnie wartości szczytowe lub obszary roztworów wzorcowych jako rzędne oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

##### 5.6.3. Roztwór próbny

Próbny ekstrakt (5.5) wstrzyknąć kilka razy, używając takiej samej objętości jak w przypadku roztworów wzorcowych, i ustalić średnią wartość szczytową (obszar) dla benzokwatu metylu.

### 6. Obliczanie wyników

Na podstawie średnich wartości (obszarów) szczytowych benzokwatu metylu w roztworze próbnym, ustalić stężenie roztworu próbnego w µg/ml przy pomocy odniesienia się do wykresu wzorcowego (5.6.2).

Zawartość benzokwatu metylu w (mg/kg) w próbce oblicza się przy pomocy następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie benzokwatu metylu w roztworze próbki w µg/ml.,

m = masa badanej porcji w gramach.

### 7. Uzasadnienie wyników

#### 7.1. Tożsamość

Tożsamość analitu może być potwierdzona przy pomocy współchromatografii lub przy użyciu detektora z zespołem diod, przy pomocy, którego widma ekstraktu próbnego i roztworu wzorcowego (3.7.3), zawierające 10 µg/ml, są porównywane.

## 7.1.1. Współchromatografia

Próbny ekstrakt jest wzmocniony przez dodanie odpowiedniej ilości pośredniego roztworu wzorcowego (3.7.2). Ilość dodanego benzokwatu metylu powinna być podobna do oszacowanej ilości benzokwatu metylu w ekstrakcie stanowiącym próbkę.

Jedynie wysokość szczytowej wartości benzokwatu metylu powinna zostać zwiększona po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość wartości szczytowej, przy połowie maksymalnej wysokości, musi mieścić się w około 10 % szerokości pierwotnej.

## 7.1.2. Detektor z zespołem diod

Wyniki są oceniane według następujących kryteriów:

- długość fali maksymalnego pochłaniania próbki i widm wzorcowych, zapisane na szczytowym wierzchołku chromatogramu, musi być taka sama w ramach marginesu ustalonego poprzez zdolność rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detektora z zespołem diod zazwyczaj jest to około 2 nm;
- między 220 a 350 nm, próbka i wzorcowe widma zapisane na szczytowym wierzchołku chromatogramu, nie mogą różnić się dla tych części widma w zakresie 10–100 % względnej absorpcji. Kryterium to jest spełnione, kiedy występują takie same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów, rozbieżność między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji wzorcowego analitu;
- między 220 a 350 nm, widma wartości rosnących, szczytowych i malejących tej samej próbki ekstraktu nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji. Kryterium to jest spełnione, kiedy występują takie same wartości maksymalne i w ramach żadnego z obserwowanych punktów, rozbieżność między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji wzorcowego analitu.

Gdy jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie została potwierdzona.

## 7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % wyższego wyniku dla stężenia benzokwatu metylu w przedziale między 4 a 20 mg/kg.

## 7.3. Odzysk

Dla wzmocnionej ślepej próbki, odzysk powinien wynieść przynajmniej 90 %.

## 8. Wyniki

Pięć próbek zostało poddanych analizie przez 10 laboratoriów. W stosunku do każdej próbki przeprowadzono podwójną analizę.

|                       | Ślepa próba | Mączka 1 | Granulat 1 | Mączka 2 | Granulat 2 |
|-----------------------|-------------|----------|------------|----------|------------|
| Wartość średnia mg/kg | n.w.        | 4,50     | 4,50       | 8,90     | 8,70       |
| Sr (mg/kg)            | –           | 0,30     | 0,20       | 0,60     | 0,50       |
| CVr (%)               | –           | 6,70     | 4,40       | 6,70     | 5,70       |
| Sr (mg/kg)            | –           | 0,40     | 0,50       | 0,90     | 1,00       |
| CVR (%)               | –           | 8,90     | 11,10      | 10,10    | 11,50      |
| Odzysk (%)            | –           | 92,00    | 93,00      | 92,00    | 89,00      |

n.w. = nie wykryto

Sr = odchylenie standardowe powtarzalności

CVr = współczynnik zmienności powtarzalności

SR = odchylenie standardowe odtwarzalności

CVR = współczynnik zmienności odtwarzalności