31999L0027

SMERNICA KOMISIE 1999/27/ES

z 20. apríla 1999,

ktorou sa zavádzajú analytické metódy spoločenstva na stanovenie amprólia, diklazurilu a karbadoxu v krmivách a ktorá mení a dopĺňa smernice 71/250/EHS, 73/46/EHS a zrušuje smernicu 74/203/EHS

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavádzaní postupov spoločenstva na odber vzoriek a analýz na kontrolu krmiva ([1]), naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení Rakúska, Fínska a Švédska, a najmä na článok 2,

(1) keďže smernica 70/373/EHS ustanovuje, že úradné kontroly krmív s cieľom overenia zhody s požiadavkami vyplývajúcimi z právneho poriadku, právnych predpisov a správnych predpisov, ktoré určujú ich kvalitu a zloženie, sa musia vykonávať s použitím metód spoločenstva na odber vzoriek a analýzu;

(2) keďže smernica Rady č. 70/524/EHS z 23. novembra 1970, ktorá sa týka prísad v krmivách ([2]), naposledy zmenená a doplnená nariadením Komisie č. 45/1999 ([3]), ustanovuje, že obsah amprólia a diklazurilu musí byť uvedený na označení v prípade, keď sa tieto látky pridávajú do zmesí a krmív; keďže sa povolenie na používanie karbadoxu ako prísady v krmivách zrušilo nariadením Komisie č. 2788/98 z 22. decembra 1998, ktoré mení a dopĺňa smernicu Rady 70/524/EHS týkajúcu sa prísad v krmivách, je vzhľadom na zrušenie povolenia pre určité látky podporujúce rast ([4]) a úradnej kontroly na výskyt možného protiprávneho používania zakázaných látok nevyhnutná;

(3) keďže sa musia ustanoviť analytické metódy spoločenstva na kontrolu týchto látok;

(4) keďže Prvá smernica Komisie č. 71/250/EHS z 15. júna 1971 zavádzajúca analytické metódy spoločenstva pre úradnú kontrolu krmív ([5]), naposledy zmenená a doplnená smernicou č. 98/54/ES ([6]), ustanovuje analytické metódy okrem iného na stanovenie horčicového oleja a teobromínu; keďže popísané metódy už nie sú platné vzhľadom na pokrok vo vedeckých a technických poznatkoch na zamýšľaný účel ich využitia; keďže je z tohto dôvodu vhodné, aby sa tieto metódy zrušili;

(5) keďže Štvrtá smernica Komisie č. 73/46/EHS z 5. decembra 1972 zavádzajúca analytické metódy spoločenstva pre úradnú kontrolu krmív ([7]), naposledy zmenená a doplnená smernicou č. 98/54/ES, ustanovuje postupy analýz okrem iného na určenie retinolu (vitamín A); keďže popísané postupy už nie sú platné vzhľadom na pokrok vo vedeckých a technických poznatkoch na zamýšľaný účel ich využitia; keďže je z tohto dôvodu vhodné, aby sa zrušila metóda pre retinol;

(6) keďže Piata smernica Komisie č. 74/203/EHS z 25. marca 1974 zavádzajúca analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív ([8]), naposledy zmenená a doplnená smernicou č. 81/680/EHS ([9]), ustanovuje analytické metódy na stanovenie škrobu a degradačných produktov s vysokou molekulovou hmotnosťou v potravinách obsahujúcich odrezky z repy, dužinu z repy, sušenú vňať z repy alebo listy, dužinu zo zemiakov, sušené kvasnice, produkty bohaté na inulín alebo oškvarky, amprólium, etobapát, initolmid, nikarbazín a menadión (vitamín K3); keďže žiadna z metód, ktoré sú popísané v tejto smernici, už nie je platná vzhľadom na pokrok vo vedeckých a technických poznatkoch pre zamýšľaný účel ich využitia; keďže je z tohto dôvodu vhodné, aby sa zrušila táto smernica;

(7) keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty zabezpečia, aby analýzy vykonané s cieľom úradných kontrol obsahu amprólia, diklaruzilu a karbadoxu v krmivách a zmesiach sa vykonávali s použitím metód, ktoré sú uvedené v prílohe k tejto smernici.

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

Článok 2

Smernica č. 71/250/EHS sa mení a dopĺňa takto:

1. V článku 1 sa vypúšťajú slová „horčicový olej“ a „teobromín“.
2. V prílohe sa vypúšťajú body 8 a 13.

Článok 3

Smernica č. 73/46/EHS sa mení a dopĺňa takto:

1. Článok 2 sa vypúšťa.
2. Príloha II sa vypúšťa.

Článok 4

Smernica č. 74/203/EHS sa zrušuje.

Článok 5

Členské štáty najneskôr do 31. októbra 1999 prijmú zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s ustanoveniami tejto smernice. Bezodkladne budú o tom informovať Komisiu.

Tieto opatrenia sa budú uplatňovať od 1. novembra 1999.

Keď členské štáty prijmú tieto opatrenia, budú obsahovať odkaz na túto smernicu, alebo sa o takýto odkaz doplnia v prípade ich oficiálneho uverejnenia. Členské štáty prijmú postupy na uskutočnenie takéhoto odkazu.

Článok 6

Táto smernica nadobudne účinnosť dvadsiaty deň po uverejnení v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Článok 7

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 20. apríla 1999

Za Komisiu

Franz FISCHLER

člen Komisie

PRÍLOHA

Časť A

STANOVENIE AMPRÓLIA

1-[(4-amino-2-propylpyrimidín-5-yl)metyl]-2-metyl-pyridiniumchlorid hydrochlorid

1. **Cieľ a rozsah**

Táto metóda je určená na stanovenie amprólia v krmivách a zmesiach. Detekčný limit je 1 mg/kg, limit stanovenia je 25 mg/kg.

2. **Princíp**

Vzorka sa extrahuje zmesou metanol-voda. Po zriedení v mobilnej fáze a membránovej filtrácii sa obsah amprólia stanoví výmenou katiónov vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) za použitia UV detektora.

3. **Reagencie**

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, HPLC kvalita

3.3. Voda, HPLC kvalita

3.4. Roztok dihydrogénfosforečnanu sodného, c = 0,1 mol/l

Rozpusťte 13,80 g monohydrátu dihydrogénfosforečnanu sodného vo vode (3.3) v 1000 ml kalibrovanej banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.

3.5. Roztok chloristanu sodného, c = 1,6 mol/l

Rozpusťte 224,74 g chloristanu sodného vo vode (3.3) v 1000 ml kalibrovanej banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.

3.6. Mobilná fáza pre HPLC (pozri poznámku 9.1)

Zmes acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrogénfosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pred použitím prefiltrujte cez 0,22 μm membránový filter (4.3) a odplyňte roztok (napr. v ultrazvukovom kúpeli (4.4) aspoň 15 minút)

3.7. Štandard: čisté amprólium, l-[(4-amino-2-propylpyrimidín-5-yl)metyl]-2-metyl-pyridiniumchlorid hydrochlorid, E 750 (pozri 9.2)

3.7.1. Zásobný štandardný roztok amprólia 500 μg/ml

Navážte s presnosťou 0,1 mg 50 mg amprólia (3.7) do 100 ml kalibrovanej banky, rozpusťte v 80 ml metanolu (3.1) a umiestnite banku na 10 min. do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte vodou po značku a zamiešajte. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.7.2. Zásobný pomocný roztok amprólia 50 μg/ml

Napipetujte 5 ml zásobného štandardného roztoku (3.7.1) do 50 ml kalibrovanej banky, doplňte extrakčným roztokom po značku (3.8) a zamiešajte. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.7.3. Kalibračné roztoky

Postupne napipetujete 0,5, 1 a 2 ml pomocného štandardného roztoku (3.7.2) do 50 ml kalibrovaných baniek. Doplňte mobilnou fázou (3.6) po značku a zamiešajte. Tieto roztoky zodpovedajú 0,5, 1 alebo 2 μg amprólia na ml. Tieto roztoky sa musia pripraviť tesne pred použitím.

3.8. Extrakčný roztok

Zmes metanol (3.1)-voda 2 + 1 (v + v).

4. **Aparatúra**

4.1. HPLC s injekčným systémom na vstrekovanie objemu 100 µl

4.1.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu 125 mm x 4 mm, menič katiónov Nucleosil 10 SA, 10 µm balenie alebo ekvivalent

4.1.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo diódový detektor

4.2. Membránový filter, PTFE materiál, 0,45 µm

4.3. Membránový filter, 0,22 µm

4.4. Ultrazvukový kúpeľ

4.5. Mechanická trepačka alebo magnetické miešadlo

5. **Postup**

5.1. *Všeobecné informácie*

5.1.1. Slepá vzorka

Na uskutočnenie regeneračného testu (5.1.2) sa musí analyzovať slepá vzorka na overenie, či nie je prítomné amprólium alebo interferujúca látka. Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a nesmie sa dokázať prítomnosť amprólia alebo interferujúcej látky.

5.1.2. Regeneračný test

Regeneračný test sa má vykonať analýzou slepej vzorky obohatenej o prídavok amprólia v približne takom množstve, ako sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie úrovne obohatenia 100 mg/kg, preneste 10 ml zásobného štandardného roztoku (3.7.1) do 250 ml Erlenmeyrovej banky a odparte roztok na približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepej vzorky, dôkladne zamiešajte a nechajte 10 minút stáť, pred uskutočnením extrakcie opäť niekoľkokrát zamiešajte (5.2).

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorke (pozri 5.1.1), regeneračný test sa môže vykonať na základe štandardnej adičnej metódy. V tomto prípade sa vzorka, ktorá má byť analyzovaná, obohatí množstvom amprólia, ktoré je približné tomu, ako sa nachádza vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a regenerácia sa môže vypočítať odčítaním.

5.2. *Extrakcia*

5.2.1. Zmesi (obsah < 1 % amprólia) a krmiva

Na základe na obsahu amprólia navážte s presnosťou 0,01 g, 5 až 40 g vzorky do 500 ml Erlenmeyerovej banky a pridajte 200 ml extrakčného roztoku (3.8). Vložte banku na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Vyberte banku z ultrazvukového kúpeľa a trepte 1 hodinu na trepačke alebo miešajte na magnetickom miešadle (4.5). Zrieďte alikvotnú časť extraktu s mobilnou fázou (3.6) na obsah amprólia 0,5 až 2 µg/ml a zamiešajte (pozri poznámku 9.3). Prefiltrujte 5 až 10 ml tohto zriedeného roztoku na membránovom filtri (4.2). Potom použite na stanovenie HPLC (5.3).

5.2.2. Zmesi (obsah 1 % amprólia)

Na základe na obsahu amprólia navážte s presnosťou 0,001 g, 1 až 4 g zmesi do 500 ml Erlenmeyerovej banky a pridajte 200 ml extrakčného roztoku (3.8). Vložte banku na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Vyberte banku z ultrazvukového kúpeľa a trepte 1 hodinu na trepačke alebo miešajte na magnetickom miešadle (4.5). Zrieďte alikvotnú časť extraktu s mobilnou fázou (3.6) na obsah amprólia 0,5 až 2 µg/ml a zamiešajte. Prefiltrujte 5 až 10 ml tohto zriedeného roztoku na membránovom filtri (4.2). Potom použite na stanovenie HPLC (5.3).

5.3. *Stanovenie za použitia HPLC*

5.3.1. Parametre:

Na účel usmernenia sa poskytujú nasledujúce špecifikácie, iné špecifikácie sa môžu použiť za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky.

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.1.1):	125 mm x 4 mm, menič katiónov Nucleosil 10 SA, 10 µm balenie alebo jeho ekvivalent
Mobilná fáza (3.6):	Zmes acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrogénfosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Prietoková rýchlosť:	0,7 to ml/min
Vlnová dĺžka stanovenia:	264 nm
Vstrekovaný objem:	100 µl

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému niekoľkonásobným vstreknutím kalibračného roztoku (3.7.3), ktorý obsahuje 1,0 µg/ml, pokiaľ sa nedosiahne konštantná výška píkov a retenčný čas.

5.3.2. Kalibračná krivka

Vstreknite každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a stanovte priemernú výšku píkov (plôch) pre každú koncentráciu. Zostavte kalibračnú krivku použitím priemerných výšok píkov (plôch) kalibračných roztokov ako súradníc a zodpovedajúcich koncentrácií v µg/ml ako úsečiek.

5.3.3. Roztok vzorky

Vstreknite niekoľkokrát rovnaký objem extraktu vzorky (5.2), ako sa použil pri kalibračných roztokoch, a stanovte priemernú výšku píku (plochy) píkov amprólia.

6. **Výpočet výsledkov**

Stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml za použitia kalibračnej krivky (5.3.2) z priemernej výšky (plochy) píkov amprólia z roztoku vzorky.

Obsah amprólia w v mg/kg vzorky je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde:

V = objem extrakčného rozpúšťadla (3.8) v ml podľa 5.2 (t. j. 200 ml)

σ = koncentrácia amprólia v extrakte vzorky (5.2) v µg/ml

f = zrieďovací faktor podľa 5.2

m = hmotnosť testovanej dávky v g

7. **Validácia výsledkov**

7.1. *Identita*

Identita analyzovanej látky sa dá potvrdiť použitím paralelnej chromatografie alebo použitím diódového detektora, ktorým sa porovnajú spektrá extraktu vzorky (5.2) a kalibračného roztoku (3.7.3) obsahujúceho 2,0 µg/ml.

7.1.1. Paralelná chromatografia

Extrakt vzorky (5.2) sa obohatí prídavkom vhodného množstva kalibračného roztoku (3.7.3). Množstvo pridaného amprólia má byť približne také, aké je množstvo amprólia nachádzajúceho sa v extrakte vzorky.

Pri zohľadnení pridaného množstva a zriedenia extraktu sa má zvýšiť iba výška píku amprólia. Šírka píku v polovici jeho výšky musí byť ± 10 % pôvodnej šírky píku amprólia v neobohatenej vzorke.

7.1.2. Diódová detekcia

Výsledky sa vyhodnocujú na základe nasledujúcich kritérií:

a) Vlnová dĺžka maximálnej absorpcie spektra vzorky a štandardu zaznamenaná na vrchole píku chromatogramu musí byť rovnaká v rámci rozmedzia danej rozlišovacej schopnosti detekčného systému. Pre diódovú detekciu je obvyklá v rozmedzí ± 2 nm.

b) V rozmedzí 210 and 320 nm sa spektrum vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10 – 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium je dodržané v prípade rovnakého maxima a keď v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorbancie štandardnej analyzovanej látky.

c) V rozmedzí 210 and 320 nm sa spektrum stúpajúcej časti, vrcholu a klesajúcej časti píku, ktoré vytvorí vzorka extraktu, nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10 – 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium je dodržané v prípade rovnakého maxima a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbancie spektra vrcholu píku.

Prítomnosť analyzovanej látky sa nepotvrdí, ak nie je dodržané jedno z týchto kritérií.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 15 % vzhľadom na vyššiu hodnotu obsahu amprólia v rozmedzí 25 mg/kg až 500 mg/kg,

— 75 mg/kg v prípade obsahu amprólia v rozmedzí 500 mg/kg a 1000 mg/kg,

— 7,5 % vzhľadom na vyššiu hodnotu obsahu amprólia nad 1000 mg/kg.

7.3. Regenerácia

V prípade obohatenej (slepej) vzorky má byť regenerácia aspoň 90 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

Kruhový test sa vykonal analýzou troch krmív pre hydinu (vzorka 1-3), jedného minerálneho krmiva (vzorka 4) a jednej zmesi (vzorka 5). Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

	Vzorka 1 (slepá vzorka)	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5
L	14	14	14	14	15
N	56	56	56	56	60
priemer (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
Nominálny obsah (mg/kg)	–	50	200	5 000	25 000

L: počet laboratórií
n: počet jednotlivých hodnôt
s_r: štandardná odchýlka opakovateľnosti
CV_r: koeficient zmeny opakovateľnosti
s_R: štandardná odchýlka reprodukovateľnosti
CV_R: koeficient zmeny reprodukovateľnosti

9. **Poznámky**

9.1. Ak vzorka obsahuje tiamín, pík tiamínu sa objavuje na chromatograme krátko pred píkom amprólia. Amprólium a tiamín sa musia na základe tejto metódy oddeliť. Ak sa amprólium a tiamín neoddelí na kolóne (4.1.1) použitej v tejto metóde, nahraďte až 50 % acetonitrilu v mobilnej fáze (3.6) metanolom.

9.2. Podľa britského liekopisu spektrum roztoku amprólia (c = 0,02 mol/l) v kyseline chlorovodíkovej (c = 0,1 mol/l) vykazuje maximum pri 246 nm a 262 nm. Absorbancia bude 0,84 pri 246 nm a 0,80 pri 262 nm.

9.3. Extrakt sa musí vždy zriediť s mobilnou fázou, pretože v opačnom prípade môže retenčný čas kvôli zmenám iónovej sily významne posunúť pík amprólia.

ČASŤ B

STANOVENIE DIKLAZURILU

(+)-4-chlórfenyl [2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazín-2-yl)fenyl]acetonitril.

1. **Cieľ a rozsah**

Táto metóda je určená na stanovenie diklazurilu v krmivách a zmesiach. Detekčný limit je 0,1 mg/kg, limit stanovenia je 0,5 mg/kg.

2. **Princíp**

Po pridaní interného štandardu sa vzorka extrahuje okysleným metanonol. Pre krmivá sa alikvotná časť extraktu purifikuje na extrakčnej náplni (cartridge) C18 s tuhou fázou. Diklazuril sa vymyje z náplne zmesou okysleného metanolu a vody. Po odparení sa zvyšok rozpustí v zmesi DMF/voda. V prípade zmesí sa extrakt odparí a zvyšok rozpustí v zmesi DMF/voda. Obsah diklazurilu sa stanoví pomocou ternárneho gradientu vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s reverznou fázou za použitia UV detektora.

3. **Reagencie**

3.1. Voda, HPLC kvalita

3.2. Octan amónny

3.3. Tetrabutylamóniumhydrogénsulfát (TBHS)

3.4. Acetonitril, HPLC kvalita

3.5. Metanol, HPLC kvalita

3.6. N,N-dimetylformamid (DMF)

3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8. Štandard: diklazuril II-24: (+)-4-chlórfenyl [2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazín-2-yl)fenyl]acetonitril garantovanej čistoty, E771

3.8.1. Zásobný štandardný roztok diklazurilu 500 µg/ml

Navážte s presnosťou 0,1 mg, 25 mg štandardu diklazurilu (3.8) do 50 ml kalibrovanej banky. Rozpusťte v DMF (3.6), doplňte DMF (3.6) po značku a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.8.2. Štandardný roztok diklazurilu 50 µg/ml

Preneste 5,00 ml zásobného štandardného roztoku (3.8.1) do 50 ml kalibrovanej banky, doplňte DMF po značku (3.6) a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.9. Interný štandard: 2,6-dichloro-α-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazín-2(3H)-yl)-α-metylbenzén-acetonitril

3.9.1. Interný zásobný štandardný roztok, 500 µg/ml

Naväžte 25 mg interného štandardu (3.9) s presnosťou 0,1 mg do 50 ml kalibrovanej banky. Rozpusťte v DMF (3.6), doplňte DMF (3.6) po značku a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.9.2. Interný štandardný roztok, 50 µg/ml

Preneste 5,00 ml zásobného štandardného roztoku (3.9.1) do 50 ml kalibrovanej banky, doplňte DMF po značku (3.6) a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.9.3. Interný štandardný roztok pre zmesi, p/1000 mg/ml (p = nominálny obsah diklazurilu v zmesi v mg/kg)

Naväžte s presnosťou 0,1 mg p/10 mg interného štandardu do 100 ml kalibrovanej banky, rozpusťte v DMF (3.6) v ultrazvukovom kúpeli (4.6), doplňte DMF po značku a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.10. Kalibračný roztok, 2 µg/ml

Napipetujte 2,00 ml štandardného roztoku diklazurilu (3.8.2) a 2,00 ml interného štandardného roztoku (3.9.2) do 50 ml kalibrovanej banky. Pridajte 16 ml DMF (3.6), doplňte vodou po značku a zamiešajte. Tento roztok sa musí pripraviť tesne pred použitím.

3.11. Extrakčná náplň (cartridge) C18 s tuhou fázou, napr. Bond Elut, veľkosť: 1 cc, hmotnosť sorbentu: 100 mg

3.12. Extrakčný roztok: okyslený metanol

Napipetujte 5,0 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.7) do 1000 ml metanolu (3.5) a zamiešajte.

3.13. Mobilná fáza pre HPLC

Vymývací roztok A: roztok octanu amónneho a tetrabutylamóniumhydrogénsulfátu

3.13.1. Rozpusťte 5 g octanu amónneho (3.2) a 3,4 g TBHS (3.3) v 1000 ml vody (3.1) a zamiešajte.

3.13.2. Vymývací roztok B: acetonitril (3.4)

3.13.3. Vymývací roztok C: metanol (3.5)

4. **Aparatúra**

4.1. Mechanická trepačka

4.2. Zariadenie na ternárny gradient HPLC

4.2.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, Hypersil ODS, 3 µm balenie, 100 mm x 4,6 mm alebo ekvivalent

4.2.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo diódový detektor

4.3. Vákuová rotačná odparka

4.4. Membránový filter, 0,45 µm

4.5. Vákuové zariadenie

4.6. Ultrazvukový kúpeľ

5. **Postup**

5.1. *Všeobecné informácie*

5.1.1. Slepá vzorka

Slepá vzorka sa musí analyzovať na overenie, či nie je prítomný diklazuril alebo interferujúca látka. Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a pri analýze sa nesmie dokázať prítomnosť diklazurilu alebo interferujúcej látky.

5.1.2. Regeneračný test

Regeneračný test sa má vykonať analýzou slepej vzorky obohatenej o prídavok diklazurilu v približne takom množstve, ako sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie úrovne obohatenia 1 mg/kg pridajte 0,1 ml zásobného štandardného roztoku (3.8.1.) do 50 g slepej vzorky, dôkladne zamiešajte a nechajte stáť 10 min., pred použitím niekoľkokrát zamiešajte (5.2.).

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorke (pozri 5.1.1), regeneračný test sa môže vykonať na základe štandardnej adičnej metódy. V tomto prípade sa vzorka, ktorá má byť analyzovaná, obohatí množstvom diklazurilu, ktoré je približné tomu, ktoré sa nachádza vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a regenerácia sa môže vypočítať odčítaním.

5.2. *Extrakcia*

5.2.1. Krmivá

Navážte 50 g vzorky s presnosťou 0,01 g. Preneste do 500 ml Erlenmeyerovej banky, pridajte 1,00 ml interného štandardného roztoku (3.9.2), 200 ml extrakčného roztoku (3.12) a banku zazátkujte. Trepte zmes na trepačke (4.1) cez noc. Nechajte ustáť 10 minút. Preneste 20 ml alikvotnej časti supernatantu do vhodnej sklenej nádoby a zrieďte 20 ml vody. Preneste tento roztok na extrakčnú náplň (cartridge) (3.11) a pomocou vákua presajte (4.5.). Premyte náplň 25 ml zmesi extrakčného roztoku (3.12) a vody, 65 + 35 (V + V). Vylejte zozbierané frakcie a vymyte zlúčeniny 25 ml zmesi extrakčného roztoku (3.12) a vody, 80 + 20 (V + V). Odparte túto frakciu dosucha na rotačnej odparke (4.3) pri 60 °C. Zvyšok rozpusťte v 1,0 ml DMF (3.6), pridajte 1,5 ml vody (3.1) a zamiešajte. Prefiltrujte cez membránový filter (4.4). Potom použite na stanovenie HPLC (5.3).

5.2.2. Zmesi

Navážte 1 g vzorky s presnosťou 0,001 g. Preneste do 500 ml Erlenmeyerovej banky, pridajte 1,00 ml interného štandardného roztoku (3.9.3), 200 ml extrakčného roztoku (3.12) a banku zazátkujte. Trepte zmes cez noc na trepačke (4.1). Nechajte ustáť 10 minút. Preneste alikvotnú časť 10 000/p ml (p = nominálny obsah diklazurilu v zmesi v mg/kg) supernatantu do primerane veľkej banky s okrúhlym dnom. Odparte dosucha pri zníženom tlaku pri 60 °C na rotačnej odparke (4.3). Znovu rozpusťte zvyšok v 10,0 ml DMF (3.6) a pridajte 15,0 ml vody (3.1) a zamiešajte. Potom použite na stanovenie HPLC (5.3).

5.3. *Stanovenie za použitia HPLC*

5.3.1. Parametre:

Na účel usmernenia sa poskytujú nasledujúce špecifikácie, iné špecifikácie sa môžu použiť za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky.

— Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.2.1)	100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 μm balenie alebo ekvivalent	
— Mobilná fáza	Vymývací roztok A (3.13.1):	Vodný roztok octanu amónneho a tetrabutylamóniumsulfátu
	Vymývací roztok B (3.13.2):	acetonitril
	Vymývací roztok C (3.13.3):	metanol

— Spôsob vymývania:	— lineárny gradient
	— počiatočnépodmienky:A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)
	— po 10 minútach vymyte gradientom počas 30 minút na:A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)
	Preplachujte pomocou B 10 minút
— Prietoková rýchlosť:	1,5 – 2 ml/min
— Vstrekovaný objem:	20 µl
— Vlnová dĺžka detektora:	280 ml

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému niekoľkonásobným vstreknutím kalibračného roztoku (3.10), ktorý obsahuje 2 µg/ml, pokiaľ sa nedosiahne konštantná výška píkov a retenčný čas.

5.3.2. Kalibračný roztok

Vstreknite niekoľkokrát 20 µl kalibračného roztoku (3.10) a stanovte priemernú výšku píku (plochy) diklazurilu a interné štandardné píky.

5.3.3. Roztok vzorky

Vstreknite 20 µl roztoku vzorky (5.2.1. or 5.2.2.) niekoľkokrát a stanovte priemernú výšku píku (plochy) diklazurilu a interných štandardných píkov.

6. **Výpočet výsledkov**

6.1. Krmivá

Obsah diklazurilu w v (mg/kg) vzorky je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde

$h_{d,s}$ = výška píku (plocha) diklazurilu v roztoku vzorky (5.2.1)

$h_{i,s}$ = výška píku (plocha) interného štandardu v roztoku vzorky (5.2.1)

$h_{d,c}$ = výška píku (plocha) diklazurilu v kalibračnom roztoku (3.10)

$h_{i,c}$ = výška píku (plocha) interného štandardu v kalibračnom roztoku (3.10)

$\sigma_{d,c}$ = koncentrácia diklazurilu v kalibračnom roztoku v µg/ml (3.10)

m = hmotnosť testovanej dávky v g

V = objem extraktu vzorky podľa 5.2.1 (t. j. 2,5 ml)

6.2. Zmesi

Obsah diklazurilu w v (mg/kg) vzorky je daný vzorcom:

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

kde

$h_{d,c}$ = výška píku (plocha) diklazurilu v kalibračnom roztoku (3.10)

$h_{i,c}$ = výška píku (plocha) interného štandardu v kalibračnom roztoku (3.10)

$h_{d,s}$ = výška píku (plocha) diklazurilu v roztoku vzorky (5.2.2)

$h_{i,s}$ = výška píku (plocha) interného štandardu v roztoku vzorky (5.2.2)

$\sigma_{d,c}$ = koncentrácia diklazurilu v kalibračnom roztoku (3.10)

m = hmotnosť testovanej dávky v g

V = objem extraktu vzorky podľa 5.2.2 (t. j. 25 ml)

p = nominálny obsah diklazurilu v mg/kg v zmesi

7. **Validácia výsledkov**

7.1. *Identita*

Identita analyzovanej látky sa dá potvrdiť použitím paralelnej chromatografie alebo použitím diódového detektora, ktorým sa porovnajú spektrá extraktu vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) a kalibračného roztoku (3.10).

7.1.1. Paralelná chromatografia

Extrakt vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) sa obohatí prídavkom vhodného množstva kalibračného roztoku (3.10). Množstvo pridaného diklazurilu má byť približne také, ako je množstvo diklazurilu nachádzajúceho sa v extrakte vzorky.

Pri zohľadnení pridaného množstva a zriedenia extraktu sa má zvýšiť iba výška píku diklazurilu a interného štandardu. Šírka píku v polovici jeho výšky musí byť ± 10 % pôvodnej šírky píku diklazurilu alebo interného štandardu v neobohatenej vzorke.

7.1.2. Diódová detekcia

Výsledky sa vyhodnocujú na základe nasledujúcich kritérií:

a) Vlnová dĺžka maximálnej absorpcie spektra vzorky a štandardu zaznamenaná na vrchole píku chromatogramu musí byť rovnaká v rámci rozmedzia danej rozlišovacej schopnosti detekčného systému. Pre diódovú detekciu je obvyklá v rozmedzí ± 2 nm.

b) V rozmedzí 230 and 320 nm sa spektrum vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10 – 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium je dodržané v prípade rovnakého maxima a keď v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorbancie štandardnej analyzovanej látky.

c) V rozmedzí 230 and 320 nm sa spektrum stúpajúcej časti, vrcholu a klesajúcej časti píku, ktoré vytvorí vzorka extraktu, nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10-100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium je dodržané v prípade rovnakého maxima a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbancie spektra vrcholu píku.

Prítomnosť analyzovanej látky sa nepotvrdí, ak nie je dodržané jedno z týchto kritérií.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 30 % vzhľadom k vyššej hodnote obsahu diklazurilu v rozmedzí 0,5 mg/kg až 2,5 mg/kg

— 0,75 mg/kg v prípade obsahu diklazurilu v rozmedzí 2,5 mg/kg a 5 mg/kg

— 15 % vzhľadom na vyššiu hodnotu obsahu diklazurilu nad 5 mg/kg

7.3. Regenerácia

V prípade obohatenej (slepej) vzorky má byť regenerácia aspoň 80 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

V 11 laboratóriách sa vykonal kruhový test piatich vzoriek. Tieto vzorky pozostávali z dvoch zmesí; jedna bola zmiešaná s organickou matricou (O 100) a ostatné s anorganickou matricou (A 100). Teoretický obsah diklazurilu je 100 mg na kg. Tri zmiešané krmivá pre hydinu vyrobili traja odlišní výrobcovia (NL) (L1/Z1/K1). Teoretický obsah je 1 mg diklazurilu na kg. Laboratória dostali pokyn, aby analyzovali každú vzorku jedenkrát alebo dvakrát. (Podrobnejšie informácie o tomto kruhovom teste sa nachádzajú vo *Vestníku AOAC International, zväzok 77, č. 6, 1994, s. 1359-1361*).Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

	Vzorka 1 A 100	Vzorka 2 O 100	Vzorka 3 L 1	Sample Z 1	Vzorka 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Priemer	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_r(mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R(mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominálny obsah (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: počet laboratórií
N: počet jednotlivých hodnôt
S_r: štandardná odchýlka opakovateľnosti
CV_r: koeficient zmeny opakovateľnosti
S_R: štandardná odchýlka reprodukovateľnosti
CV_R: koeficient zmeny reprodukovateľnosti

9. **Poznámky**

Musí byť vopred dokázané, že signál diklazurilu je lineárny v rozsahu meraných koncentrácií.

Časť C

STANOVENIE KARBADOXU

Metyl-3-(2-chinoxalinylmetylén)karbazát N^1,N^4-dioxid

1. **Cieľ a rozsah**

Táto metóda je určená na stanovenie karbadoxu v krmivách, zmesiach a prípravkoch. Detekčný limit je 1 mg/kg. Limit stanovenia je 10 mg/kg.

2. **Princíp**

Vzorka sa vyvažuje vodou a extrahuje zmesou metanol-acetonitril. Pre krmivá sa alikvotná časť filtrovaného extraktu prečistí na kolóne z oxidu hlinitého. V prípade zmesí a prípravkov sa alikvotná časť filtrovaného extraktu zriedi na vhodnú koncentráciu vodou, metanolom a acetonitrilom. Obsah karbadoxu sa stanoví pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s reverznou fázou za použitia UV detektora.

3. **Reagencie**

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, HPLC kvalita

3.3. Kyselina octová, w = 100 %

3.4. Oxid hlinitý: neutrálny, aktivita I

3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v)

Zmiešajte 500 ml metanolu (3.1) s 500 ml acetonitrilu (3.2).

3.6. Kyselina octová, σ = 10 %

Zrieďte 10 ml octovej kyseliny (3.3) vodou do 100 ml.

3.7. Octan sodný, CH_3COONa

3.8. Voda, HPLC kvalita

3.9. Octanový tlmivý roztok, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0

Rozpuťte 0,82 g octanu sodného (3.7) v 700 ml vody (3.8) a upravte pH kyselinou octovou (3.6) na 6,0. Preneste do 1 000 ml kalibrovanej banky, doplňte vodou (3.8) po značku a zamiešajte.

3.10. Mobilná fáza pre HPLC

Zmiešajte 825 ml octanového tlmivého roztoku (3.9) s 175 ml acetonitrilu (3.2). Prefiltrujte cez 0,22 µm filter (4.5) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút).

3.11. Štandard:

Čistý karbadox: Metyl-3-(2-chinoxalinylmetylén)karbazát N^1,N^4-dioxid, E 850

3.11.1. Zásobný štandardný roztok karbadoxu 100 µg/ml (pozri bod 5 Postup):

Navážte 25 mg štandardu karbadoxu (3.11) s presnosťou 0,1 mg do 250 ml kalibrovanej banky. Rozpusťte ultrazvukom (4.7) v metanol-acetonitrole (3.5). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte metanol-acetonitrilom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou alebo použite nádobu z hnedého skla a uložte do chladničky. Roztok je stabilný 1 mesiac pri teplote 4 °C.

3.11.2. Kalibračné roztoky

Preneste postupne 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.11.1) do 100 ml kalibrovaných baniek. Pridajte 30 ml vody, doplňte metanol-acetonitrilom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaľte banku alumíniovou fóliou. Tieto roztoky zodpovedajú 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 µg/ml karbadoxu. Kalibračné roztoky sa musia pripraviť tesne pred použitím.

Poznámka: Na stanovenie karbadoxu v krmivách obsahujúcich menej ako 10 mg/kg sa musia pripraviť kalibračné roztoky s koncentráciou menšou ako 2,0 µg/ml.

3.12. Voda-[metanol-acetonitril] (3.5) zmes, 300 + 700 (v + v)

Zmiešajte 300 ml vody so 700 ml zmesi metanol-acetonitril (3.5).

4. **Aparatúra**

4.1. Laboratórna trepačka alebo magnetické miešadlo

4.2. Papierový filter zo skleného vlákna (Whatman GF/A alebo ekvivalent)

4.3. Sklená kolóna (dĺžka 300 až 400 mm, vnútorný priemer asi 10 mm) s fritou zo sintrovaného skla a odčerpávacím ventilom.

Poznámka: Môže sa použiť sklená kolóna s uzatváracím kohútom alebo sklená kolóna so zúženým koncom, v druhom prípade sa do dolného konca vloží malá zátka zo sklenej vaty a utlačí sa pomocou sklenej tyčinky.

4.4. HPLC s injekčným systémom na vstrekovanie objemu 20 µl

4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu: 300 mm x 4 mm, C18, 10 µm balenie alebo ekvivalent

4.4.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo diódový detektor pracujúci v rozsahu 225 až 400 nm.

4.5. Membránový filter, 0,22 µm

4.6. Membránový filter, 0,45 µm

4.7. Ultrazvukový kúpeľ

5. **Postup**

Poznámka: Karbadox je citlivý na svetlo. Vykonávajte všetky činnosti pri tlmenom svetle alebo používajte nádoby s hnedým sklom alebo sklené nádoby obalené alumíniovou fóliou.

5.1. *Všeobecné informácie*

5.1.1. Slepá vzorka

Na uskutočnenie regeneračného testu (5.1.2) sa musí analyzovať slepá vzorka na overenie, či nie je prítomný karbadox alebo interferujúca látka. Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a pri analýze sa nesmie dokázať prítomnosť karbadoxu alebo interferujúcej látky.

5.1.2. Regeneračný test

Regeneračný test sa má vykonať analýzou slepej vzorky (5.1.1) obohatenej o prídavok karbadoxu v približne takom množstve, ako sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie úrovne obohatenia 50 mg/kg pridajte 5,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.11.1) do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Odparte roztok na približne 0,5 ml v prúde dusíka. Pridajte 10 g slepého roztoku, zamiešajte a nechajte 10 minút stáť pred uskutočnením extrakcie (5.2).

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorke (pozri 5.1.1), regeneračný test sa môže vykonať na základe štandardnej adičnej metódy. V tomto prípade sa vzorka obohatí množstvom karbadoxu, ktoré je približné tomu, ako sa nachádza vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a regenerácia sa dá vypočítať odčítaním.

5.2. *Extrakcia*

5.2.1. Krmivá

Navážte s presnosťou 0,01 g asi 10 g vzorky a preneste do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 15,0 ml vody, zamiešajte a nechajte ustáliť 5 minút. Pridajte 35,0 ml metanol-acetonitrilu (3.5), zazátkujte a trepte 30 minút na trepačke alebo miešajte na magnetickom miešadle (4.1). Prefiltrujte roztok cez filtračný papier zo sklených vlákien (4.2). Tento roztok uchovajte na purifikáciu (5.3).

5.2.2. Zmesi (0,1 až 2,0 %)

Navážte s presnosťou 0,01 g asi 1 g nepomletej vzorky a preneste do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 15,0 ml vody, zamiešajte a nechajte ustáliť 5 minút. Pridajte 35,0 ml metanol-acetonitrilu (3.5), zazátkujte a trepte 30 minút na trepačke alebo miešajte na magnetickom miešadle (4.1). Prefiltrujte roztok cez filtračný papier zo sklených vlákien (4.2). Napipetujte alikvotnú časť do 50 ml kalibrovanej banky. Pridajte 15,0 ml vody, doplňte metanol-acetonitrilom (3.5) po značku a zamiešajte. Koncentrácia karbadoxu vo výslednom roztoku má byť okolo 10 µg/ml. Alikvotná časť sa prefiltruje cez 0,45 µm filter (4.6). Potom použite na stanovenie HPLC (5.4).

5.2.3. Prípravky (> 2 %)

Navážte s presnosťou 0,001 g asi 0,2 g nepomletej vzorky a preneste do 250 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 45,0 ml vody, zamiešajte a nechajte ustáliť 5 minút. Pridajte 105,0 ml metanol-acetonitrolu (3.5), zazátkujte a homogenizujte. Sonifikujte (4.7) vzorku 15 minút a potom trepte alebo miešajte 15 minút (4.1). Prefiltrujte roztok cez filtračný papier zo sklených vlákien (4.2). Zrieďte alikvotnú časť filtrátu zmesou voda-metanol-acetonitril (3.12) na výslednú koncentráciu karbadoxu 10-15 µg/ml (pre 10 % prípravok je zrieďovací faktor 10). Alikvotná časť sa prefiltruje cez 0,45 µm filter (4.6). Potom použite na stanovenie HPLC (5.4).

5.3. *Purifikácia*

5.3.1. Príprava kolóny s oxidom hlinitým

Navážte 4 g oxidu hlinitého (3.4) a preneste do sklenej kolóny (4.3).

5.3.2. Purifikácia vzorky

Naneste 15 ml prefiltrovaného extraktu (5.2.1) na kolónu s oxidom hlinitým a vylejte prvé 2 ml eluátu. Zachyťte ďalších 5 ml a prefiltrujte alikvotnú časť cez 0,45 µm filter (4.6). Potom použite na stanovenie HPLC (5.4).

5.4. *Stanovenie za použitia HPLC*

5.4.1. Parametre:

Na účel usmernenia sa poskytujú nasledujúce špecifikácie, iné špecifikácie sa môžu použiť za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky.

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.1.1):	300 mm x 4 mm, C18, 10 µm balenie alebo ekvivalent
Mobilná fáza (3.10):	Zmes octanového tlmivého roztoku (3.9) a acetonitrilu (3.2), 825 + 175 (v + v)
Prietoková rýchlosť:	1,5-2 ml/min
Vlnová dĺžka stanovenia:	365 nm
Vstrekovaný objem:	20 µl

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému niekoľkonásobným vstreknutím kalibračného roztoku (3.11.2), ktorý obsahuje 5,0 µg/ml, pokiaľ sa nedosiahne konštantná výška píkov (plôch) a retenčný čas.

5.4.2. Kalibračná krivka

Vstreknite každý kalibračný roztok (3.11.2) niekoľkokrát a zmerajte výšku píkov (plôch) pre každú koncentráciu. Zostavte kalibračnú krivku použitím priemerných výšok píkov alebo plôch kalibračných roztokov ako súradníc a zodpovedajúcich koncentrácií v µg/ml ako úsečiek.

5.4.3. Roztok vzorky

Vstreknite niekoľkokrát extrakt vzorky [(5.3.2) pre krmivá, (5.2.2) pre zmesi a (5.2.3) pre prípravky] a stanovte priemernú výšku píku (plochu) píkov karbadoxu.

6. **Výpočet výsledkov**

Stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml za použitia kalibračnej krivky (5.4.2) z priemernej výšky (plochy) píkov karbadoxu z roztoku vzorky.

6.1. Krmivá

Obsah karbadoxu w v (mg/kg) vzorky je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde:

σ = koncentrácia karbadoxu v extrakte vzorky (5.3.2) in µg/ml;

V_1 = extrakčný objem v ml (t. j. 50);

m = hmotnosť testovanej dávky v g.

6.2. Zmesi a prípravky

Obsah karbadoxu w v (mg/kg) vo vzorke je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde:

σ = koncentrácia karbadoxu v extrakte vzorky (5.2.2 alebo 5.2.3) in µg/ml;

V_2 = extrakčný objem v ml (t. j. 50 pre zmesi; 150 pre prípravky);

f = zrieďovací faktor podľa 5.2.2 (zmesi) alebo 5.2.3 (prípravky);

m = hmotnosť testovanej dávky v g.

7. **Validácia výsledkov**

7.1. Identita

Identita analyzovanej látky sa dá potvrdiť použitím paralelnej chromatografie alebo použitím diódového detektora, ktorým sa porovnajú spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.11.2) obsahujúceho 10,0 µg/ml.

7.1.1. Paralelná chromatografia

Extrakt vzorky sa obohatí prídavkom vhodného množstva kalibračného roztoku (3.11.2). Množstvo pridaného karbadoxu má byť približne také, ako je množstvo karbadoxu nachádzajúceho sa v extrakte vzorky.

Pri zohľadnení pridaného množstva a zriedenia extraktu sa má zvýšiť iba výška píku karbadoxu. Šírka píku v polovici jeho maximálnej výšky musí byť v rozmedzí okolo 10 % pôvodnej šírky.

7.1.2. Diódová detekcia

Výsledky sa vyhodnocujú na základe nasledujúcich kritérií:

a) Vlnová dĺžka maximálnej absorpcie spektra vzorky a štandardu zaznamenaná na vrchole píku chromatogramu musí byť rovnaká v rámci rozmedzia danej rozlišovacej schopnosti detekčného systému. Pre diódovú detekciu je obvyklá v rozmedzí ± 2 nm.

b) V rozmedzí 225 and 400 nm sa spektrum vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium sa dodrží v prípade rovnakého maxima a keď v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorbancie štandardnej analyzovanej látky.

c) V rozmedzí 225 and 400 nm sa spektrum stúpajúcej časti, vrcholu a klesajúcej časti píku, ktoré vytvorí vzorka extraktu, nesmie odlišovať od častí spektra v rozmedzí 10 až 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium sa dodrží v prípade rovnakého maxima a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbancie spektra vrcholu.

Prítomnosť analyzovanej látky sa nepotvrdí, ak nie je dodržané jedno z týchto kritérií.

7.2. Opakovateľnosť

Pre obsah 10 mg/kg a vyšší nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke presiahnuť 15 % vzhľadom k vyššej hodnote.

7.3. Regenerácia

V prípade obohatenej (slepej) vzorky má byť regenerácia aspoň 90 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

V ôsmych laboratóriách sa vykonal kruhový test šiestich krmív, štyroch zmesí a troch prípravkov. Každá vzorka sa analyzovala dvakrát. (Podrobnejšie informácie o tomto kruhovom teste sa nachádzajú vo *Vestníku AOAC International, zväzok 71, 1988, s. 484-490*). Výsledky (okrem extrémnych hodnôt) sú uvedené nižšie:

Tabuľka 1. Výsledky kruhového testu pre krmivá

	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5	Vzorka 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Priemer (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r(mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R(mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominálny obsah (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabuľka 2. Výsledky kruhového testu pre zmesi a prípravky

	Zmesi				Prípravky		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Priemer (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
Nominálny obsah (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: počet laboratórií
n: počet jednotlivých hodnôt
s_r: štandardná odchýlka opakovateľnosti
CV_r: koeficient zmeny opakovateľnosti
S_R: štandardná odchýlka reprodukovateľnosti
CV_R: koeficient zmeny reprodukovateľnosti