31999L0027

L 118/36 *URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI* 6.5.1999

DIREKTIVA KOMISIJE 1999/27/ES

z dne 20. aprila 1999

o določitvi analitskih metod Skupnosti za določanje amproliuma, diklazurila in karbadoksa v krmi in spremembi direktiv 71/250/EGS in 73/46/EGS ter o razveljavitvi Direktive 74/203/EGS

(Besedilo velja za EGP)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Avstrije, Finske in Švedske, ter zlasti člena 2 Direktive,

(1) ker Direktiva 70/373/EGS zahteva, da se uradni nadzor krme izvaja z uporabo metod Skupnosti vzorčenja in analiz zaradi preverjanja izpolnjevanja zahtev, določenih z zakoni in drugimi predpisi, v zvezi s kakovostjo in sestavo krme;

(2) ker Direktiva Sveta 70/524/EGS z dne 23. novembra 1970 o dodatkih v krmi ([2]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo Komisije 45/1999 ([3]), določa, da mora biti vsebnost amproliuma in diklazurila navedena na oznaki, če sta snovi dodani premiksom in krmi; ker je Uredba Komisije 2788/98 z dne 22. decembra 1998 o spremembi Direktive Sveta 70/524/EGS o dodatkih v krmi glede preklica odobritve nekaterih pospeševalcev rasti ([4]) preklicala dovoljenje za uporabo karbadoksa v krmi in je potreben uradni nadzor morebitne nezakonite uporabe prepovedanih snovi;

(3) ker je treba za te snovi v Skupnosti določiti analitske metode Skupnosti;

(4) ker Prva direktiva Komisije 71/250/EGS z dne 15. junija 1971 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ([5]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 98/54/ES ([6]), določa med drugim analitske metode za določanje gorčičnega olja in teobromina; ker navedene metode niso več uporabne za ta namen zaradi napredka v znanosti in tehnologiji; ker jih je torej primerno črtati;

(5) ker Četrta direktiva Komisije 73/46/EGS z dne 5. decembra 1972 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ([7]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 98/54/ES, določa med drugim analitske metode za določanje tiamina (vitamin B1, anevrin) ter določanje askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline (vitamin C); ker navedene metode niso več uporabne za ta namen zaradi napredka v znanosti in tehniki; ker jih je torej primerno črtati;

(6) ker Peta direktiva Komisije 74/203/EGS z dne 25. marca 1974 o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ([8]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 81/680/EGS ([9]), določa analitske metode za določanje škroba in razkrojnih produktov škroba visoke molekulske mase v krmi, ki vsebujejo koščke ali pulpo repe, posušene repne glave ali liste, krompirjevo pulpo, suhi kvas, proizvode z visoko vsebnostjo inulina ali ocvirkov, amproliuma, etopabata, dinitolmida, nikarbazina in menadiona (vitamin K3); ker metode, opisane v navedeni direktivi, niso več uporabne za ta namen zaradi napredka v znanosti in tehniki; ker je torej primerno navedeno direktivo razveljaviti;

(7) ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zagotovijo, da se analize za uradni nadzor vsebnosti amproliuma, diklazurila in karbadoksa v krmi in premiksih izvajajo po metodah, določenih v Prilogi k tej direktivi.

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

Člen 2

Direktiva 71/250/EGS se spremeni:

1. V členu 1 se črta besedilo „gorčično olje“ in „teobromin“.
2. V Prilogi se črtata točki 8 in 13.

Člen 3

Direktiva 73/46/EGS se spremeni:

1. Člen 2 se črta.
2. Priloga II se črta.

Člen 4

Direktiva 74/203/EGS se razveljavi.

Člen 5

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. oktobra 1999. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Ukrepe začnejo uporabljati 1. novembra 1999.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

Člen 6

Ta direktiva začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Člen 7

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 20. aprila 1999

Za Komisijo

Franz FISCHLER

Član Komisije

PRILOGA

Del A

DOLOČANJE AMPROLIUMA

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridin klorid hidroklorid

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo določamo vsebnost amproliuma v krmi in premiksih. Meja zaznavanja je 1 mg/kg, meja določanja pa 25 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z mešanico metanola in vode. Po redčenju z mobilno fazo in membransko filtracijo vsebnost amproliuma določimo s kationsko izmenjevalno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo detektorja UV.

3. **Reagenti**

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, za HPLC.

3.3 Voda, za HPLC.

3.4 Raztopina natrijevega dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l

V 1 000-mililitrski merilni bučki v vodi (3.3) raztopimo 13,80 g natrijevega dihidrogen fosfata monohidrata, dopolnimo z vodo (3.3) do oznake in premešamo.

3.5 Raztopina natrijevega perklorata, c = 1,6 mol/l

V 1 000-mililitrski merilni bučki v vodi (3.3) raztopimo 224,74 g natrijevega perklorata monohidrata, dopolnimo z vodo (3.3) do oznake in premešamo.

3.6 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (glej opombo 9.1).

Mešanica acetonitrila (3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (3.4) in raztopine natrijevega perklorata (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pred uporabo filtriramo z membranskim filtrom 0,22 µm (4.3) in raztopino razplinimo (npr. najmanj 15 minut v ultrazvočni kopeli (4.4)).

3.7 Standardna substanca: čisti amprolium, l-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridin klorid hidroklorid, E 750 (glej 9.2).

3.7.1 Osnovna standardna raztopina amproliuma, 500 µg/ml

S točnostjo 0,1 mg natehtamo 50 mg amproliuma (3.7) v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopimo v 80 ml metanola (3.1) in bučko za 10 minut postavimo v ultrazvočno kopel (4.4). Po ultrazvočni obdelavi ohladimo raztopino na sobno temperaturo, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Pri temperaturi < 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.7.2 Vmesna standardna raztopina amproliuma, 50 µg/ml

Odpipetiramo 5 ml osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z ekstrakcijskim topilom (3.8) do oznake in premešamo. Pri temperaturi < 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.7.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50-ml merilnih bučk odpipetiramo 0,5, 1 in 2 ml vmesne standardne raztopine (3.7.2). Bučke dopolnimo do oznake z mobilno fazo (3.6) in premešamo. Te raztopine ustrezajo 0,5, 1 in 2 µg amproliuma na mililiter. Pripravimo jih sveže pred uporabo.

3.8 Ekstrakcijsko topilo

Mešanica vode in metanola (3.1) 2 + 1 (v + v).

4. **Oprema**

4.1 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje volumnov 100 µl.

4.1.1 Kromatografske tekočinske kolone 125 mm x 4 mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 10 µm ali ekvivalentna.

4.1.2 Detektor UV z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod.

4.2 Membranski filter, material PTFE, 0,45 µm.

4.3 Membranski filter, 0,22 µm.

4.4 Ultrazvočna kopel.

4.5 Mehanski stresalnik ali magnetno mešalo.

5. **Postopek**

5.1 *Splošno*

5.1.1 Slepa krma

Za zmogljivost izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo, da preverimo, ali niso prisotni niti amprolium niti moteče substance. Slepa krma mora biti podobna krmi vzorca in v njej ne smemo zaznati niti amproliuma niti motečih snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo ji dodali določeno količino amproliuma, podobno vsebnosti v vzorcu. Za obogatitev pri 100 mg/kg amproliuma prenesemo 10 ml osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 250-mililitrsko erlenmajerico in izparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, dobro premešamo, pustimo 10 minut in pri tem večkrat premešamo, preden nadaljujemo z ekstrakcijo (5.2).

Če nimamo slepe krme, ki bi bila podobna krmi vzorca (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo z metodo standardnega dodatka. V tem primeru vzorcu za analizo dodamo toliko amproliuma, kolikor ga je v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega amproliuma, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

5.2 *Ekstrakcija*

5.2.1 Premiksi (vsebnost amproliuma < 1 %) in krma

V 500-mililitrsko erlenmajerico natehtamo s točnostjo 0,01 g 5 do 40 g vzorca, glede na vsebnost amproliuma, in dodamo 200 ml ekstrakcijskega topila (3.8). Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.4) in jo pustimo v njej 15 minut. Nato jo odstranimo iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresamo s stresalnikom ali mešamo z magnetnim mešalom (4.5). Alikvot ekstrakta razredčimo z mobilno fazo (3.6), da dobimo vsebnost amproliuma od 0,5 do 2 µg/ml in premešamo (glej opombo 9.3). Nato 5 do 10 ml tako razredčene raztopine filtriramo skozi membranski filter (4.2). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

5.2.2 Premiksi (vsebnost amproliuma ≥ 1 %)

V 500-mililitrsko erlenmajerico natehtamo s točnostjo 0,001 g 1 do 4 g premiksa, glede na vsebnost amproliuma, in dodamo 200 ml ekstrakcijskega topila (3.8). Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.4) in jo pustimo v njej 15 minut. Nato jo odstranimo iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresamo s stresalnikom ali mešamo z magnetnim mešalom (4.5). Alikvot ekstrakta razredčimo z mobilno fazo (3.6), da dobimo vsebnost amproliuma od 0,5 do 2 µg/ml, in premešamo. Nato 5 do 10 ml tako razredčene raztopine filtriramo skozi membranski filter (4.2). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

5.3 *Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)*

5.3.1 Parametri:

Navedeni pogoji so podani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Tekočinska kromatografska kolona (4.1.1):	125 mm x 4 mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 10 µm ali ekvivalent.
Mobilna faza (3.6):	Mešanica acetonitrila (3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (3.4) in raztopine natrijevega perklorata (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Pretok:	0,7 do 1 ml/min.
Valovna dolžina:	264 nm.
Volumen vbrizga:	100 µl.

Preverimo stabilnost kromatografskega sistema tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 1,0 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

5.3.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.7.3) večkrat vbrizgamo in določimo srednjo vrednost višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo enake volumne ekstrakta vzorca (5.2), kakršne smo uporabili za raztopine za umeritev, in določimo povprečno višino (površino) vrhov amproliuma.

6. **Izračun rezultatov**

Iz srednje vrednosti višine (površine) vrhov amproliuma v raztopini vzorca določimo koncentracijo v raztopini vzorca v µg/ml iz umeritvene krivulje (5.3.2).

Vsebnost amproliuma w v mg/kg vzorca izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = \frac{v \cdot \delta \cdot f}{m} [mg/kg]$$

pri čemer je:

V = volumen ekstrakcijskega topila (3.8) v ml v skladu s 5.2 (to je 200 ml)

δ = = koncentracija amproliuma v ekstraktu vzorca (5.2), v µg/ml

f = faktor razredčitve v skladu s 5.2

m = masa preskusnega vzorca, v g

7. **Validacija rezultatov**

7.1 *Identiteta*

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2) in raztopine za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 2,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (5.2) obogatimo s primerno množino raztopine za umeritev (3.7.3). Množina dodanega amproliuma mora biti podobna množini amproliuma, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko le višina vrha amproliuma, potem ko smo upoštevali dodano množino, pa tudi razredčenje raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine vrha amproliuma v vzorcu, ki mu amprolium ni bil dodan.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednja merila:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod normalno ± 2 nm.

(b) Med 210 in 320 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbance standardnega analita.

(c) Med 210 in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Kadar eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

— 15 % relativno, glede na višjo vsebnost amproliuma med 25 mg/kg in 500 mg/kg

— 75 mg/kg za vsebnosti amproliuma med 500 mg/kg in 1 000 mg/kg

— 7,5 % relativno, glede na višjo vsebnost amproliuma nad 1 000 mg/kg

7.3 Izkoristek

Za obogateni (slepi) vzorec mora biti izkoristek najmanj 90 %.

8. **Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije**

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri so bile analizirane tri perutninske krme (vzorci 1–3), ena mineralna krma (vzorec 4) in en premiks (vzorec 5). Rezultati so prikazani v naslednji tabeli

	Vzorec 1 (slepa krma)	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Srednja vrednost (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
Nominalna vsebnost (mg/kg)	–	50	200	5 000	25 000

L: število laboratorijev
n: število posameznih vrednosti
s_r: standardni odklon ponovljivosti
CV_r: koeficient variacije ponovljivosti
s_R: standardni odklon obnovljivosti
CV_R: koeficient variacije obnovljivosti

9. **Opombe**

9.1 Če vzorec vsebuje tiamin, se vrh tiamina v kromatogramu pojavi malo pred vrhom amproliuma. Pri tej metodi moramo amprolium in tiamin ločiti. Če amproliuma in tiamina nismo ločili s kolono (4.1.1), ki se uporablja pri tej metodi, zamenjamo do 50 % dela acetonitrila v mobilni fazi (3.6) z metanolom.

9.2 Britanska Pharmacopoea pravi, da ima spekter raztopine amproliuma (c = 0,02 mol/l) v klorovodikovi kislini (c = 0,1 mol/l) maksimuma pri 246 nm in 262 nm. Absorbanca bi morala znašati 0,84 pri 246 nm in 0,80 pri 262 nm.

9.3 Ekstrakt moramo vedno razredčiti z mobilno fazo, ker bi se sicer retenzijski čas vrha amproliuma občutno premaknil zaradi sprememb v ionski moči.

DEL B

DOLOČANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril.

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo določamo vsebnost diklazurila v krmi in premiksih. Meja zaznavnosti je 0,1 mg/kg, meja določanja pa 0,5 mg/kg.

2. **Princip**

Po dodatku internega standarda ekstrahiramo vzorec z nakisanim metanolom. Pri krmi del ekstrakta prečistimo na kartuši C18 za ekstrakcijo v trdni fazi. Diklazuril iz kartuše eluiramo z mešanico nakisanega metanola in vode. Po izparevanju ostanek raztopimo v raztopini DMF in vode. Pri premiksih ekstrakt izparevamo in nato ostanek raztopimo v raztopini DMF in vode. Vsebnost diklazurila določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo s ternarnim gradientom, z uporabo detektorja UV.

3. **Reagenti**

3.1 Voda, za HPLC.

3.2 Amonijev acetat.

3.3 Tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBHS).

3.4 Acetonitril, za HPLC.

3.5 Metanol, za HPLC.

3.6 N,N-dimetilformamid (DMF).

3.7 Klorovodikova kislina, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8 Standardna substanca: diklazuril II-24: (+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril zajamčene čistoče, E771.

3.8.1 Osnovna standardna raztopina diklazurila, 500 µg/ml

V 50-mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg standardne substance diklazurila (3.8) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v DMF (3.6), bučko dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.8.2 Standardna raztopina diklazurila, 50 µg/ml

5,00 ml osnovne standardne raztopine (3.8.1) prenesemo v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.9 Interni standard: 2,6 dikloro-α-(4-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H) - il) α-metilbenzen-acetonitril.

3.9.1 Osnovna raztopina internega standarda, 500 µg/ml

V 50-mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg internega standarda (3.9) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v DMF (3.6), bučko dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.9.2 Raztopina internega standarda, 50 µg/ml

5,00 ml osnovne raztopine internega standarda (3.9.1) prenesemo v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.9.3 Raztopina internega standarda za premikse, p/1 000 mg/ml (p = nominalna vsebnost diklazurila v premiksu v mg/kg).

S točnostjo 0,1 mg natehtamo p/10 mg substance internega standarda v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopimo v DMF (3.6) v ultrazvočni kopeli (4.6), dopolnimo z DMF do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.10 Raztopina za umeritev, 2 µg/ml.

Odpipetiramo 2,00 ml standardne raztopine diklazurila (3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (3.9.2) v 50-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 16 ml DMF (3.6), bučko dopolnimo do oznake z vodo in premešamo. To raztopino moramo pripraviti svežo tik pred uporabo.

3.11 Ekstrakcijska kartuša za trdno fazo C18, npr. Bond Elut, velikost: 1 cc, masa absorbenta: 100 mg.

3.12 Ekstrakcijsko topilo: nakisani metanol.

Odpipetiramo 5,0 ml klorovodikove kisline (3.7) v 1 000 ml metanola (3.5) in premešamo.

3.13 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

Eluent A:raztopina amonijevega acetata in tetrabutilamonijevega hidrogen sulfata.

3.13.1 V 1 000 ml vode (3.1) raztopimo 5 g amonijevega acetata (3.2) in 3,4 g TBHS (3.3) ter premešamo.

3.13.2 Eluent B: acetonitril (3.4).

3.13.3 Eluent C: metanol (3.5).

4. **Oprema**

4.1 Mehanski stresalnik.

4.2 Oprema za HPLC s terciarnim gradientom.

4.2.1 Tekočinske kromatografske kolone, hypersil ODS, polnitev 3 µm, 100 mm x 4,6 mm ali ekvivalentna.

4.2.2 Detektor UV z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod.

4.3 Rotacijski vakuumski uparjalnik

4.4 Membranski filter, 0,45 µm.

4.5 Vakuumski ventil.

4.6 Ultrazvočna kopel.

5. **Postopek**

5.1 *Splošno*

5.1.1 Slepa krma

Slepo krmo analiziramo za preveritev, da ni ne diklazurila ne motečih substanc. Slepa krma mora biti podobna tisti v vzorcu in pri analizi ne smemo zaznati diklazurila ali motečih substanc.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo tako, da analiziramo slepo krmo, ki smo jo obogatili s toliko diklazurila, kolikor ga je v vzorcu. Da dobimo l mg/kg, dodamo 0,1 ml osnovne standardne raztopine (3.8.1) v 50 g slepe krme, dobro premešamo in pustimo 10 min, pred nadaljevanjem (5.2) pa večkrat dobro premešamo.

Če pa slepe krme, ki bi bila podobna tisti v vzorcu, nimamo (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo po metodi standardnega dodatka. V tem primeru vzorec za analizo obogatimo s količino diklazurila, podobno tisti, ki je že v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega amproliuma, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

5.2 *Ekstrakcija*

5.2.1 Krma

S točnostjo 0,01 g natehtamo približno 50 g vzorca. Prenesemo v 500-mililitrsko erlenmajerico, dodamo 1,00 ml raztopine internega standarda (3.9.2), 200 ml ekstrakcijskega topila (3.12) in zamašimo erlenmajerico. Mešanico stresamo v stresalniku (4.1) prek noči. Pustimo 10 minut, da se umiri. Prenesemo 20 ml alikvot bistre raztopine nad oborino v primerno stekleno posodo in razredčimo z 20 ml vode. To raztopino prenesemo na ekstrakcijsko kartušo (3.11) in jo skoznjo prepustimo z vakuumom (4.5). Kartušo speremo s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (3.12) in vode, 65 + 35 (V + V). Zavržemo zbrane frakcije in eluiramo spojine s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (3.12) in vode, 80 + 20 (V + V). To frakcijo uparimo v rotacijskem uparjalniku (4.3) pri 60 °C do prve sušine. Ostanek raztopimo v 1,0 ml DMF (3.6), dodamo 1,5 ml vode (3.1) in premešamo. Filtriramo skozi membranski filter (4.4). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

5.2.2 Premiksi

S točnostjo 0,001 g natehtamo približno 1 g vzorca. Prenesemo v 500-mililitrsko erlenmajerico, dodamo 1,00 ml raztopine internega standarda (3.9.3), 200 ml ekstrakcijskega topila (3.12) in zamašimo erlenmajerico. Mešanico stresamo v stresalniku (4.1) prek noči. Pustimo 10 minut, da se umiri. Prenesemo alikvot, ki vsebuje 10 000/p ml (p = nominalna vsebnost diklazurila v premiksu v mg/kg), bistre raztopine nad oborino v primerno veliko bučko z okroglim dnom. Uparevamo do prve sušine pri znižanem tlaku pri 60 °C v rotacijskem uparjalniku (4.3). Ostanek ponovno raztopimo v 10,0 ml DMF (3.6), dodamo 15,0 ml vode (3.1) in premešamo. Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

5.3 *Določanje tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)*

5.3.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

— Tekočinske kromatografske kolone (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, hypersil ODS, polnitev 3 µm ali ekvivalent.	
— Mobilna faza:	Eluat A (3.13.1):	vodna raztopina amonijevega acetata in tetrabutilamonijevega hidrogen sulfata
	Eluat B (3.13.2):	acetonitril
	Eluat C (3.13.3):	metanol

— Način eluiranja:	— linearni gradient
	— začetni pogoji: A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)
	— po 10 minutah gradientno eluiranje 30 minut v: A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)
	10 minut izpiramo z B
— Pretok:	1,5 – 2 ml/min
— Volumen vbrizga:	20 µl
— Valovna dolžina detektorja:	280 nm

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.10), ki vsebuje 2 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

5.3.2 Raztopina za umeritev

Večkrat vbrizgamo 20 µl raztopine za umeritev (3.10) in določimo srednjo vrednost višine (površine) vrhov diklazurila in vrhov raztopine internega standarda.

5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo 20 µl raztopine vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) in določimo srednjo vrednost višine (površine) vrha diklazurila in raztopine internega standarda.

6. **Izračun rezultatov**

6.1 Krma

Vsebnost diklazurila w (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

$h_{d,s}$ = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini vzorca (5.2.1)

$h_{i,s}$ = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini vzorca (5.2.1)

$h_{d,c}$ = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{i,c}$ = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini za umeritev (3.10)

$\delta_{d,c}$ = koncentracija diklazurila v raztopini za umeritev, v µg/ml (3.10)

m = masa preskusnega vzorca, v gramih

V = volumen ekstrakta vzorca v skladu s 5.2.1 (to je 2,5 ml)

6.2 Premiksi

Vsebnost diklazurila w (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

$h_{d,c}$ = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{i,c}$ = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{d,s}$ = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini vzorca (5.2.2)

$h_{i,s}$ = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini vzorca (5.2.2)

$\delta_{d,c}$ = koncentracija diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

m = masa preskusnega vzorca, v gramih

V = volumen ekstrakta vzorca v skladu s 5.2.2 (to je 25 ml)

p = nominalna vsebnost diklazurila v mg/kg v premiksu

7. **Validacija rezultatov**

7.1 *Identiteta*

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporaba detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) in raztopine za umeritev (3.10).

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) dodamo primerno množino raztopine za umeritev (3.10). Množina dodanega diklazurila mora biti podobna množini diklazurila, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana smeta biti le vrhova diklazurila in internega standarda, potem ko smo upoštevali tako dodano množino in razredčitev raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine vrha diklazurila ali vrha internega standardnega v vzorcu, ki mu diklazuril ni bil dodan.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo v skladu z naslednjimi merili:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektra vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod navadno ± 2 nm.

(b) Med 230 in 320 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbance standardnega analita.

(c) Med 230 in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Če eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

— 30 % relativno, glede na višjo vsebnost diklazurila med 0,5 mg/kg in 2,5 mg/kg

— 0,75 mg/kg za vsebnosti diklazurila med 2,5 mg/kg in 5 mg/kg

— 15 % relativno, glede na višjo vsebnost diklazurila nad 5 mg/kg

7.3 Izkoristek

Za obogateni (slepi) vzorec mora biti izkoristek najmanj 80 %.

8. **Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije**

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, pri kateri so v 11 laboratorijih analizirali pet vzorcev. Vzorce sta sestavljala dva premiksa; eden je bil mešan z organsko matriko (O 100) in drug z anorgansko matriko (A 100). Teoretična vsebnost je 100 mg diklazurila na kg. Tri mešane perutninske krme so naredili trije različni proizvajalci (NL) (L1/Z1/K1). Teoretična vsebnost je 1 mg diklazurila na kg. Laboratorijem so naročili, naj analizirajo vsak vzorec enkrat ali dvakrat. (Za natančnejše podatke o navedeni primerjalni študiji glej *Journal of AOAC International, knjiga 77, št. 6, 1994, str. 1359–1361*). Rezultati so navedeni v naslednji tabeli:

	Vzorec 1 A 100	Vzorec 2 O 100	Vzorec 3 L1	Vzorec 4 Z1	Vzorec 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Povprečje	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
Nominalna vsebnost (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: število laboratorijev
n: število posameznih vrednosti
S_r: standardni odklon ponovljivosti
CV_r: koeficient variacije ponovljivosti
S_R: standardni odklon obnovljivosti
CV_R: koeficient variacije obnovljivosti

9. **Opombe**

Predhodno moramo dokazati, da je odziv diklazurila v območju koncentracij, ki jih merimo, linearen.

Del C

DOLOČANJE KARBADOKSA

Metil 3-(2-kvinoksalinilmetilen)karbazat N1,N4-dioksid

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo določamo vsebnost karbadoksa v krmi, premiksih in preparatih. Meja zaznavanja je 1 mg/kg, meja določanja pa 10 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorec uravnotežimo z vodo in ekstrahiramo z metanol-acetonitrilom. Pri krmi alikvot filtriranega ekstrakta prečistimo na koloni iz aluminijevega oksida. Pri premiksih in preparatih alikvot filtriranega ekstrakta razredčimo do primerne koncentracije z vodo, metanolom in acetonitrilom. Vsebnost karbadoksa določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo detektorja UV.

3. **Reagenti**

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, za HPLC.

3.3 Ocetna kislina, w = 100 %.

3.4 Aluminijev oksid: nevtralni, stopnja aktivnosti *I*.

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

500 ml metanola (3.1) zmešamo s 500 ml acetonitrila (3.2).

3.6 Ocetna kislina, σ = 10 %.

10 ml ocetne kisline (3.3) razredčimo z vodo do 100 ml.

3.7 Natrijev acetat, CH_3COONa.

3.8 Voda za HPLC.

3.9 Raztopina acetatnega pufra, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

V 700 ml vode (3.8) raztopimo 0,82 g natrijevega acetata (3.7) in z ocetno kislino (3.6) naravnamo pH na 6,0. Prelijemo v 1 000-mililitrsko merilno bučko, z vodo (3.8) dopolnimo do oznake in premešamo.

3.10 Mobilna faza za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

825 ml raztopine acetatnega pufra (3.9) zmešamo s 175 ml acetonitrila (3.2). Filtriramo skozi filter 0,22 μm (4.5) in raztopino razplinimo (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli).

3.11 Standardna substanca.

Čisti karbadoks: metil 3-(2-kvinoksalinilmetilen)karbazat N^1,N^4-dioksid, E 850.

3.11.1 Osnovna standardna raztopina karbadoksa, 100 μg/ml (glej točko 5: Postopek):

V 250-mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg standardne substance karbadoksa (3.11) s točnostjo 0,1 mg. V ultrazvočni kopeli (4.7) raztopimo v metanol-acetonitrilu (3.5). Po ultrazvočni obdelavi ohladimo raztopino do sobne temperature, dopolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo ali uporabimo posodo iz rjavega stekla in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi ≤ 4 °C je raztopina stabilna en mesec.

3.11.2 Raztopine za umeritev

2,0, 5,0, 10,0 in 20,0 ml osnovne standardne raztopine (3. 11.1) prenesemo v 100-mililitrske merilne bučke. Dodamo 30 ml vode, bučke do oznake napolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) in premešamo. Bučke ovijemo v aluminijevo folijo. Te raztopine ustrezajo 2,0, 5,0, 10,0 in 20,0 μg/ml karbadoksa. Raztopine za umeritev pripravimo sveže pred uporabo.

Opomba: Za določanje karbadoksa v krmi, ki vsebuje manj kakor 10 mg/kg, moramo pripraviti raztopine za umeritev s koncentracijo, nižjo od 2,0 μg/ml.

3.12 Mešanica voda-[metanol-acetonitril] (3.5), 300 + 700 (v + v)

300 ml vode zmešamo s 700 ml mešanice metanol-acetonitrila (3.5).

4. **Oprema**

4.1 Laboratorijski stresalnik ali magnetni mešalnik.

4.2 Filtrirni papir iz steklenih vlaken (Whatman GF/A ali ustrezen).

4.3 Steklena kolona (dolžina 300 do 400 mm, notranji premer približno 10 mm) s sintrano stekleno frito in odtočnim ventilom.

Opomba: Lahko se uporablja tudi steklena kolona s petelinčkom ali zamaškom; v tem primeru se v spodnji konec vstavi majhen zamašek iz steklene volne in potlači s stekleno palčko.

4.4 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje po 20 μl.

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo: 300 mm x 4 mm, C18, polnitev 10 μm ali ekvivalentna.

4.4.2 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod v območju 225 do 400 nm.

4.5 Membranski filter, 0,22 μm.

4.6 Membranski filter, 0,45 μm.

4.7 Ultrazvočna kopel.

5. **Postopek**

Opomba: Karbadoks je občutljiv za svetlobo. Vse postopke opravljamo pri zmanjšani svetlobi ali uporabljamo posodo iz rjavega stekla ali zavito v aluminijevo folijo.

5.1 *Splošno*

5.1.1 Slepa krma.

Za preskus izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo za preveritev, da ni ne karbadoksa ne motečih substanc. Slepa krma mora biti podobna krmi vzorca in pri preskusu ne smemo zaznati karbadoksa ali motečih substanc.

5.1.2 Preskus izkoristka.

Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme (5.1.1), ki smo jo obogatili z določeno količino karbadoksa, podobno količini v vzorcu. Da dobimo 50 mg/kg karbadoksa, prenesemo 5,0 ml osnovne standardne raztopine (3.11.1) v 200-mililitrsko erlenmajerico. Raztopino uparimo na približno 0,5 ml v toku dušika. Dodamo 10 g slepe krme, premešamo, pustimo 10 minut in nadaljujemo z ekstrakcijo (5.2).

Če pa slepe krme, ki bi bila podobna tisti v vzorcu, nimamo (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo po metodi standardnega dodatka. V tem primeru v vzorcu za analizo dodamo količino karbadoksa, podobno tisti, ki je že v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega karbadoksa, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

5.2 *Ekstrakcija*

5.2.1 Krma.

Natehtamo približno 10 g vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 200-mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 15,0 ml vode, premešamo in pustimo 5 minut. Dodamo 35,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in stresamo 30 minut na stresalniku ali mešamo z magnetnim mešalcem (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). To raztopino obdržimo za prečiščevanje (5.3).

5.2.2 Premiksi (0,1 do 2,0 %).

Natehtamo približno 1 g nezdrobljenega vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 200-mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 15,0 ml vode, premešamo in pustimo stati 5 minut. Dodamo 35,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in stresamo 30 minut na stresalniku ali mešamo z magnetnim mešalcem (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). Odpipetiramo alikvot filtrata v 50-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 15,0 ml vode, bučko do oznake napolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) in premešamo. Koncentracija karbadoksa v končni raztopini mora biti približno 10 µg/ml. Alikvot filtriramo skozi filter 0,45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

5.2.3 Preparati (> 2 %).

Natehtamo približno 0,2 g nezdrobljenega vzorca s točnostjo 0,001 g in ga prenesemo v 250-mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 45,0 ml vode, premešamo in pustimo stati 5 minut. Dodamo 105,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in premešamo. Vzorec 15 minut obdelujemo v ultrazvočni kopeli (4.7), nato ga 15 minut stresamo ali mešamo (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). Alikvot filtrata razredčimo z mešanico vode, metanola in acetonitrila (3.12), da dobimo končno koncentracijo karbadoksa 10–15 µg/ml (za 10-odstotni preparat je faktor razredčitve 10). Alikvot filtriramo skozi filter 0,45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

5.3 *Čiščenje*

5.3.1 Priprava kolone iz aluminijevega oksida.

Natehtamo 4 g aluminijevega oksida (3.4) in ga prenesemo v stekleno kolono (4.3).

5.3.2 Čiščenje vzorca.

15 ml filtriranega ekstrakta (5.2.1) nanesemo na kolono iz aluminijevega oksida in zavržemo prva 2 ml eluata. Naslednjih 5 ml zberemo in alikvot filtriramo skozi filter 0.45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

5.4 *Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)*

5.4.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kromatografska kolona (4.1.1):	300 mm x 4 mm, C 18, polnitev 10 µm ali ekvivalentna.
Mobilna faza (3.10):	Mešanica raztopine acetatnega pufra (3.9) in acetonitrila (3.2), 825 + 175 (v + v).
Pretok:	1,5 do 2 ml/min.
Valovna dolžina detekcije:	365 nm.
Volumen vbrizga:	20 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.11.2), ki vsebuje 5,0 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin (površin) vrhov in retenzijskih časov.

5.4.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.11.2) večkrat vbrizgamo in izmerimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo raztopino vzorca [(5.3.2) za krmo, (5.2.2) za premikse in (5.2.3) za preparate] in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov karbadoksa.

6. **Izračun rezultatov**

Iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov karbadoksa raztopine vzorca določimo koncentracijo v raztopini vzorca v µg/ml iz umeritvene krivulje (5.4.2).

6.1 Krma:

Vsebnost karbadoksa w (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

δ = koncentracija karbadoksa v ekstraktu vzorca (5.3.2), v µg/ml.

V_1 = volumen ekstrakta, v ml (to je 50).

M = masa preskusnega vzorca, v gramih.

6.2 Premiksi in preparati.

Vsebnost karbadoksa w (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

δ = koncentracija karbadoksa v ekstraktu vzorca (5.2.2 ali 5.2.3), v µg/ml.

V_2 = volumen ekstrakta v ml (to je 50 za premikse; 150 za preparate).

F = faktor razredčitve v skladu s 5.2.2 (premiksi) ali 5.2.3 (preparati).

M = masa preskusnega vzorca, v gramih.

7. **Validacija rezultatov**

7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.11.2), ki vsebuje 10,0 μg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca dodamo primerno množino raztopine za umeritev (3.11.2). Množina dodanega karbadoksa mora biti enaka množini karbadoksa, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko le višina vrha karbadoksa, potem ko smo upoštevali dodano množino in tudi razredčitev raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove maksimalne višine mora biti znotraj 10 % njegove prvotne širine.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednja merila:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod normalno ± 2 nm.

(b) Med 225 in 400 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbance standardnega analita.

(c) Med 225 in 400 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Če eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita substance ni potrjena.

7.2 Ponovljivost.

Za vsebnost 10 mg/kg in več razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % relativno glede na višji rezultat.

7.3 Izkoristek.

Na obogatenem (slepem) vzorcu mora biti izkoristek najmanj 90 %.

8. **Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije**

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri je osem laboratorijev analiziralo šest vrst krme, štiri premikse in tri preparate. Za vsak vzorec sta bili izvedeni dve analizi. (Za natančnejše podatke o navedeni skupni raziskavi glej *Journal of AOAC, knjiga 71, št. 1988, 484, str. 484–490.)* Rezultati (razen izjem) so prikazani spodaj:

Tabela 1: Rezultati primerjalne študije krme

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Srednja vrednost (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
Nominalna vsebnost (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabela 2: Rezultati primerjalne študije premiksov in preparatov

	Premiksi				Preparati		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Srednja vrednost (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
Nominalna vsebnost (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: število laboratorijev
n: število posameznih vrednosti
S_r: standardni odklon ponovljivosti
CV_r: koeficient variacije ponovljivosti
S_R: standardni odklon obnovljivosti
CV_R: koeficient variacije obnovljivosti