31999L0027

DIRECTIVA 1999/27/CE A COMISIEI
din 20 aprilie 1999
de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru dozarea de amproliu, diclazuril și carbadox în furaje, de modificare a Directivelor 71/250/CEE, 73/46/CEE și de abrogare a Directivei 74/203/CEE

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([1]), modificată ultima dată de actul de aderare a Austriei, Finlandei și Suediei, în special articolul 2,

întrucât:

(1) Directiva 70/373/CEE prevede că respectivele controale oficiale ale furajelor care au drept obiectiv să se constate dacă se respectă condițiile prevăzute în temeiul actelor cu putere de lege sau actelor administrative privind calitatea și compoziția lor trebuie să se efectueze în conformitate cu modalitățile de prelevare de probe și metodele comunitare de analiză.

(2) Directiva 70/524/CEE a Consiliului din 23 noiembrie 1970 privind aditivii din hrana animalelor ([2]), modificată ultima dată de Regulamentul (CE) nr. 45/1999 ([3]) al Comisiei prevede necesitatea de a se menționa pe etichetă conținutul de amproliu și diclazuril, atunci când aceste substanțe sunt adăugate preamestecurilor și furajelor combinate; întrucât autorizarea de a utiliza carbadoxul ca aditiv în furaje a fost retrasă prin Regulamentul (CE) nr. 2788/98 al Comisiei din 22 decembrie1998 de modificare a Directivei 70/524/CEE a Consiliului privind aditivii din hrana animalelor în ceea ce privește retragerea autorizării anumitor factori de creștere ([4]) și întrucât este necesar să se efectueze controlul oficial privind eventuale utilizări abuzive ale substanțelor interzise;

(3) trebuie stabilite metode de analiză comunitare prin care să se constate prezența acestor substanțe;

(4) prima Directivă 71/250/CEE a Comisiei din 15 iunie 1971 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([5]), astfel cum a fost modificată ultima dată de Directiva 98/54/CE ([6]), stabilește metode de analiză care permit să se determine în special conținutul de esență de mușt ar și teobromină; întrucât, având în vedere progresul cunoștințelor științifice și tehnice, metodele descrise nu mai sunt adaptate obiectivului urmărit; întrucât, prin urmare, ar trebui să se renunțe la aceste metode;

(5) a patra Directivă 73/46/CEE a Comisiei din 5 decembrie 1972 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([7]), modificată ultima dată de Directiva 98/54/CE, stabilește metode de analiză care permit determinarea conținutului de retinol (vitamina A); întrucât, ținând seama de progresul cunoștințelor științifice și tehnice, metoda descrisă nu mai este adaptată obiectivului avut în vedere; întrucât, prin urmare, ar trebui eliminată metoda referitoare la retinol;

(6) a cincea Directivă 74/203/CEE a Comisiei din 25 martie 1974 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([8]), modificată de Directiva 81/680/CEE ([9]), stabilește metode de analiză pentru dozajul conținutului de amidon și de produse de degradare a amidonului cu greutate moleculară mare al alimentelor care conțin tăiței de sfeclă de zahăr, pulpă, frunze sau tulpini uscate de sfeclă, pulpă de cartof, drojdii deshidratate, produse bogate în inulină sau jumări, și pentru dozajul conținutului de amproliu, etopabat, dinitolmidă (DOT), nicarbazină și menadionă (vitamina K3); întrucât, ținând seama de progresul cunoștințelor științifice și tehnice, nici una dintre metodele descrise nu mai este adaptată obiectivului avut în vedere; întrucât, prin urmare, directiva în cauză ar trebui abrogată;

(7) măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre prevăd ca analizele efectuate pentru controalele oficiale ale conținutului de amproliu, diclazuril și carbadox din hrana pentru animale și preamestecuri să fie realizate în conformitate cu metodele prezentate în anexa la prezenta directivă.

([1]) JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
([2]) JO L 270, 14.12.1970, p. 1.
([3]) JO L 6, 12.1.1999, p. 3.
([4]) JO L 347, 23.12.1988, p. 31.
([5]) JO L 155, 12.7.1971, p. 13.
([6]) JO L 208, 24.7.1998, p. 49.
([7]) JO L 83, 30.3.1973, p. 21.
([8]) JO L 108, 22.4.1974, p. 7.
([9]) JO L 246, 29.8.1981, p. 32.

Articolul 2

Directiva 71/250/CEE se modifică astfel:

1. La articolul 1, termenii „esență de muștar” și „teobromină” se elimină.

2. Punctele 8 și 13 din anexă se elimină.

Articolul 3

Directiva 75/46/CEE se modifică după cum urmează:

1. Articolul 2 se elimină.

2. Anexa II se elimină.

Articolul 4

A cincea Directivă 74/203/CEE se abrogă.

Articolul 5

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 31 octombrie 1999. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Statele membre aplică dispozițiile în cauză de la 1 noiembrie1999.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele conțin o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

Articolul 6

Prezenta directivă intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 7

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 20 aprilie 1999.

Pentru Comisie

Franz FISCHLER

Membru al Comisiei

ANEXĂ

Partea A

DOZAJUL AMPROLIULUI

Clorhidrat de clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidin)metil]-2-picolină

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite dozarea amproliului în hrana pentru animale și preamestecuri. Limita de detecție este de 1 mg/kg, limita de dozaj este de 25 mg/kg

2. **Principiu**

Proba este supusă unei extrageri printr-un amestec de metanol/apă. După diluarea într-o fază mobilă și filtrarea prin membrană, conținutul de amproliu se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLHP) cu schimb de cationi cu ajutorul unui detector UV.

3. **Reactivi**

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, având calitatea CLHP

3.3. Apă, având calitatea CLHP

3.4. Soluție de fosfat monosodic, c = 01 mol/l

Se dizolvă 13,80 g de fosfat monosodic monohidratat în apă (3.3), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.3) și se amestecă.

3.5. Soluție de perclorat de sodiu, c = 1,6 mol/l

Se dizolvă 224,74 g de perclorat de sodiu monohidratat în apă (3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.3) și se amestecă.

3.6. Fază mobilă pentru CLHP (vezi punctul 9.1)

Amestec de acetonitril (3.2), soluție de fosfat monosodic (3.4) și soluție de perclorat de sodiu (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V). Înainte de utilizare, se trece printr-un filtru cu membrana de 0,22 µm (4.3) și se degazează soluția [de exemplu într-o baie ultrasonică (4.4) timp de cel puțin 15 minute].

3.7. Substanță etalon: amproliu pur, clorhidrat de clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidin)metil]-2-picolină, E750 (a se vedea 9.2).

3.7.1. Soluție-mamă a etalonului de amproliu, 500 µg/ml

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,1 mg, 50 mg de amproliu (3.7) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în 80 ml de metanol (3.1) și se așează balonul timp de 10 min. într-o baie ultrasonică (4.4). După tratamentul ultrasonic, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.7.2. Soluție etalon intermediară de amprolium, 50 µg/ml

Se introduc cu pipeta 5,0 ml din soluția-mamă a etalonului (3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu solvent de extracție (3.8) și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.7.3. Soluții de etalonare

Se transferă 0,5, 1,0, și 2,0 ml din soluția etalon intermediară (3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (3.6) și se amestecă. Aceste soluții corespund la 0,5, 1,0 și respectiv 2,0 µg de amproliu pe ml. Ele trebuie reînnoite la fiecare întrebuințare.

3.8. Solvent de extracție

Amestec de metanol (3.1) – apă 2 + 1 (V + V).

4. **Aparatura**

4.1. Echipament CLHP cu sistem de injecție care permite injectarea unor volume de 100 µl.

4.1.1. Coloana pentru cromatografie lichidă de 125 mm x 4 mm cu schimb de cationi, umplută cu Nucleosil 10 SA de 10 µm sau echivalent.

4.1.2. Detector UV cu lungime de undă variabila sau detector de diode cu linii transversale.

4.2. Filtru cu membrană, material PTFE, de 0,45 µm.

4.3. Filtru cu membrană de 0,22 µm.

4.4. Baie ultrasonică.

4.5. Agitator mecanic sau amestecător magnetic.

5. **Mod de operare**

5.1. *Generalități*

5.1.1. Aliment probă martor

Pentru efectuarea testului de recuperare (5.1.2), se analizează un aliment probă pentru a verifica absența amproliului sau a unor substanțe interferente. Alimentul probă trebuie să fie de același tip cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze nici amproliu nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza alimentului probă la care s-a adăugat o cantitate de amproliu similară celei prezente în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml din soluția de bază etalon (3.7.1) într-un balon conic de 250 ml și se concentrează soluția prin evaporare la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g din alimentul probă, se amestecă cu grijă și se lasă să stea 10 minute, amestecându-se din nou de mai multe ori înainte de a trece la extracție (5.2).

În mod alternativ, în lipsa unui aliment probă de același tip cu eșantionul (a se vedea 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform acestei metode prin adăugarea etalonului. În acest caz, eșantionul de analizat este suplimentat cu o cantitate de amproliu similară cu cea deja prezentă în eșantion. Acesta este analizat cu eșantionul care nu a fost suplimentat și recuperarea poate fi calculată prin diferență.

5.2. *Extracția*

5.2.1. Preamestecuri (conținut < 1 % amproliu) și hrană pentru animale

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,01 g, 5–40 g din eșantion, în funcție de conținutul său de amproliu, într-un balon conic de 500 ml și se adaugă 200 ml de solvent de extracție (3.8). Se așează balonul timp de 15 minute în baia ultrasonică (4.4). Se scoate balonul din baia ultrasonică și se agită cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (4.5) timp de 1 oră. Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (3.6), pentru a se obține un conținut de amprolium de 0,5–2µg/ml și se amestecă (a se vedea observația 9.3). Se filtrează 5–10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (4.2). Se efectuează dozajul prin CLHP (5.3).

5.2.2. Preamestecuri (conținut ≤ 1 % amproliu)

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,001 g, 1–4 g de preamestec în funcție de conținutul său de amproliu într-un balon conic de 500 ml și se adaugă 200 ml solvent de extracție (3.8). Se așează balonul timp de 15 minute în baia ultrasonică (4.4). Se scoate balonul din baia ultrasonică și se agită cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (4.5) timp de 1 oră. Se diluează o parte alicotă de extract cu faza mobilă (3.6) pentru a obține un conținut de amproliu de 0,5–2 µg/ml și se amestecă. Se filtrează 5–10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (4.2). Se efectuează dozajul prin CLHP (5.3).

5.3. *Dozaj CLHP*

5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu indicativ; se pot aplica și alte condiții dacă dau rezultate echivalente.

Coloană cromatografică lichidă (4.1.1):	125 mm × 4 mm cu schimb de cationi cu Nucleosil 10 SA de 10 µm, sau echivalent.
Fază mobilă (3.6):	Amestec de acetonitril (3.2) cu soluție de fosfat monosodic (3.4) și soluție de perclorat sodic (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).
Debit:	0,7-1 ml/min.
Lungime undă de detecție:	264 nm.
Volum de injectare:	100 µl.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de etalonare (3.7.3) care conține 1,0 µg/ml până când se obțin înălțimi ale semnalului și timpi de reținere constanți.

5.3.2. Curba de etalonare

Se injectează fiecare soluție de etalonare (3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se stabilește o curbă de etalonare utilizându-se înălțimile (suprafețele) medii ale vârfurilor soluțiilor de etalonare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare în µg/ml ca abscise.

5.3.3. Soluția eșantionului

Se injectează extractul din probă (5.2) de mai multe ori utilizându-se același volum ca și cel reținut pentru soluțiile de etalonare și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de amproliu.

6. **Exprimarea rezultatelor**

Plecând de înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de amproliu din soluția probei, se determină conținutul soluției probei în µg/ml în raport cu curba de etalonare (5.3.2.).

Conținutul w de amproliu, exprimat în mg/kg din probă, este dat de următoarea formulă:

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

formulă în care:

V = volumul solventului de extracție (3.8) în ml conform 5.2 (adică 200 ml).

δ = conținutul de amproliu al extractului din eșantion (5.2) în µg/ml.

f = factorul de diluare conform 5.2.

m = masa porției de probă în g.

7. Validarea rezultatelor

7.1. *Identitate*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau cu ajutorul unui detector cu linii transversale de diode care permite compararea spectrelor extractului din eșantion (5.2) și al soluției de etalonare (3.7.3) care conține 2,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

Unui extract din probă (5.2) i se adaugă o cantitate adecvată din soluția de etalonare (3.7.3). Cantitatea de amproliu adăugată trebuie să fie similară cantității de amproliu constatată în extractul din eșantion.

Numai înălțimea vârfului de amproliu trebuie să fie mărită, ținând cont de cantitatea adăugată și de diluția extractului. Lățimea vârfului la jumătatea înălțimii trebuie să se situeze la ± 10 % din lățimea inițială a vârfului de amproliu din extractul din probă care nu a fost suplimentată.

7.1.2. Detectarea prin linii transversale de diode

Se evaluează rezultatele după următoarele criterii:

(a) lungimea de undă de absorbție maximă a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la apexul vârfului pe cromatogramă, trebuie să fie aceeași într-o limită determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detectarea prin linii transversale de diode, ea este în general de ± 2 nm;

(b) între 210 și 320 nm, spectrele probei și etalonului înregistrate la apexul vârfului cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între cele două spectre nu depășește 15 % din absorbanța etalonului de analizat.

(c) între 210 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale apexului și ale curbei descendente ale vârfului produse de extractul din eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între spectre nu depășește 15 % din absorbanța spectrului apexului vârfului.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două dozaje paralele efectuate pe aceeași probă nu trebuie să depășească:

— 15 % din rezultatul superior pentru conținuturile de amproliu situate între 25 și 500 mg/kg;

— 75 mg/kg pentru conținuturile de amproliu situate între 500 și 1 000 mg/kg;

— 7,5 % din rezultatul superior pentru conținuturile de amproliu mai mari de 1 000 mg/kg

7.3. Recuperare

Pentru o probă suplimentată, randamentul trebuie să fie de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu între laboratoare**

S-a organizat un studiu între laboratoare, în cursul căruia au fost analizate trei tipuri de hrană pentru păsări de curte (probele 1–3), un furaj mineral (proba 4) și un preamestec (proba 5). Rezultatele studiului figurează mai jos:

	Proba 1 (furaj martor)	Proba 2	Proba 3	Proba 4	Proba 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Medie (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
Conținut nominal (mg/kg)	–	50	200	5 000	25 000

L: număr de laboratoare.
n: număr de valori individuale.
s_r: devierea standard a repetabilității.
Cv_r: coeficientul de variație al repetabilității.
s_R: devierea standard a reproductibilității.
CV_R: coeficientul de variație al reproductibilității.

9. **Observații**

9.1. În cazul în care proba conține tiamină, vârful tiaminei în cromatogramă apare puțin înaintea vârfului amproliumului. Conform acestei metode, amproliul și tiamina trebuie să fie separate. În cazul în care amproliul și tiamina nu sunt separate prin coloana (4.1.1) utilizată în această metodă, se înlocuiește până la 50 % din porția de acetonitril din faza mobilă (3.6) cu metanol.

9.2. Conform Farmacopeei Britanice, spectrul soluției de amproliu (c = 0,02 mol/l) în acid clorhidric (c = 0,1 mol/l) prezintă valori maxime la 246 nm și 262 nm. Absorbanța va fi de 0,84 la 246 nm și de 0,80 la 262 nm.

9.3. Extractul trebuie întotdeauna să fie diluat cu faza mobilă, altfel timpul de reținere al vârfului de amproliu se poate schimba în mod semnificativ din cauza variațiilor forței ionice.

PARTEA B

DOZAJUL DICLAZURILULUI

2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-il]benzen-acetonitril

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite dozarea diclazurilului în furaje și preamestecuri. Limita de detecție este de 0,1 mg/kg; limita de dozaj este de 0,5 mg/kg.

2. **Principiu**

După adăugarea unei probe interne, proba este extrasă cu ajutorul metanolului acidifiat. În cazul hranei pentru animale, o parte alicotă din extract se purifică într-un cartuș C18 pentru extracția în faza solidă. Se eluează diclazurilul din cartuș cu ajutorul unui amestec de metanol acidifiat și apă. După evaporare, reziduul se dizolvă în amestec DMF/apă. Pentru preamestecuri, extractul se evaporă și reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Conținutul de diclazuril se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLHP) la gradiente ternare și în fază inversată, cu ajutorul unui detector UV.

3. **Reactivi**

3.1. Apă de calitatea CLHP.

3.2. Acetat de amoniu.

3.3. Sulfat acid de tetrabutilamoniu (TBHS).

3.4. Acetonitril, de calitatea CLHP.

3.5. Metanol, de calitatea CLHP.

3.6. N,N–dimetilformamidă (DMF).

3.7. Acid clorhidric, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8. Substanță etalon: diclazuril II-24: 2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-il]benzen-acetonitril, garantat pur, E771.

3.8.1. Soluția-mamă a etalonului de diclazuril, 500 µg/ml.

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de diclazuril (3.8) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (3.6), se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se învelește balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un balon opac și se introduce în frigider. La o temperatură de ≤4 °C, soluția este stabilă o lună.

3.8.2. Soluția etalon de diclazuril, 50 µg/ml.

Se transferă 5,00 ml din soluția-mamă a etalonului (3.8.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se învelește balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un balon opac și se introduce în frigider. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă o lună.

3.9. Etalon intern: 2,6 dicloro-alfa-(4-clorofenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-il]alfa-metilbenzen-acetonitril.

3.9.1. Soluția-mamă a etalonului intern, 500 µg/ml.

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon intern (3.9) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (3.6), se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se învelește balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un balon opac și se introduce în frigider. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă o lună.

3.9.2. Soluția etalonului intern, 50 µg/ml

Se transferă 5,00 ml din soluția-mamă a etalonului intern (3.9.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se învelește balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un balon opac și se introduce în frigider. La o temperatură de ≤4 °C, soluția este stabilă o lună.

3.9.3. Soluția etalonului intern pentru preamestecuri, p/1 000 mg/ml (p = conținutul nominal de diclazuril al preamestecului în mg/kg)

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,1 mg, p/10 mg de etalon intern într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în DMF (3.6) într-o baie ultrasonică (4.6), se completează până la semn cu DMF și se amestecă. Se învelește balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un balon opac și se introduce în frigider. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă o lună.

3.10. Soluția de etalonare, 2 µg/ml

Se toarnă cu pipeta 2,00 ml din soluția etalon de diclazuril (3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 16 ml de DMF (3.6), se completează până la semn cu apă și se amestecă. Această soluție trebuie preparată de fiecare dată când este folosită.

3.11. Cartușul C 18 pentru extracție în fază solidă, de exemplu Bond Elut, mărimea: 1 cc, masa de sorbție 100 ml.

3.12. Solvent de extracție: metanol acidifiat.

Se toarnă cu pipeta 5,0 ml de acid clorhidric (3.7) în 1 000 ml metanol (3.5) și se amestecă.

3.13. Faza mobilă pentru CLHP.

Eluant A: acetat de amoniu – soluție de sulfat acid de tetrabutilamoniu.

3.13.1. Se dizolvă 5 g de acetat de amoniu (3.2) și 3,4 g de TBHS (3.3) în 1 000 ml apă (3.1) și se amestecă.

3.13.2. Eluant B. acetonitril (3.4).

3.13.3. Eluant C: metanol (3.5).

4. **Aparatura**

4.1. Agitator mecanic.

4.2. Echipament pentru CLHP cu gradiente ternare.

4.2.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, umplută cu Hypersil ODS de 3 µm, 100 mm × 4,6 mm, sau echivalent.

4.2.2. Detector UV cu lungime de undă variabilă sau detector cu linii transversale de diode.

4.3. Evaporator rotativ sub vid.

4.4. Filtru cu membrană de 0,45 µm.

4.5. Distribuitor la vid.

4.6. Baie ultrasonică.

5. **Mod de operare**

5.1. *Generalități*

5.1.1. Aliment probă martor

Se analizează un aliment probă pentru a verifica lipsa diclazurilului sau a substanțelor interferente. Alimentul probă trebuie să fie de același tip cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze nici diclazuril, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza alimentului probă la care s-a adăugat o cantitate de diclazuril similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 1 mg/kg, se adaugă 0,1 ml din soluția-mamă a etalonului (3.8.1) la 50 g din alimentul probă, se amestecă cu grijă și se lasă să stea 10 minute, se amestecă din nou de mai multe ori înainte de a se trece la extracție (5.2).

În mod alternativ, în lipsa unui aliment probă de același tip ca eșantionul (a se vedea 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei, adăugându-se etalonul. În acest caz, eșantionul de analizat se suplimentează cu o cantitate de diclazuril asemănătoare celei deja prezente în eșantion. Acesta este analizat cu eșantionul care nu a fost suplimentat și recuperarea poate fi calculată prin diferență.

5.2. *Extracția*

5.2.1. Hrana pentru animale

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,01 g, aproximativ 50 g de eșantion. Se transferă într-un balon conic de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (3.9.2), 200 ml din solventul de extracție (3.12) și se astupă balonul. Se agită amestecul pe agitator (4.1) timp de o noapte. Se lasă să se așeze 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 20 ml din supernatant într-un recipient de sticlă adecvat și se diluează în 20 ml apă. Se transferă această soluție într-un cartuș de extracție (3.11) și se filtrează sub vid (4.5). Se spală cartușul cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (3.12) și de apă, 65 + 35 (V + V). Se elimină fracțiile colectate și se eluează compușii cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (3.12) și apă, 80 + 20 (V + V). Se evaporă această fracție până când începe să se usuce cu ajutorul unui evaporator rotativ (4.3) la 60 °C. Se dizolvă reziduul în 1,0 ml de DMF (3.6), se adaugă 1,5 ml apă (3.1) și se amestecă. Se filtrează cu un filtru cu membrană (4.4). Se efectuează dozajul prin CLHP (5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântărește, cu o marjă de eroare de 0,001 g, aproximativ 1 g de eșantion. Se transferă într-un balon conic de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (3.9.3) și 200 ml din solventul de extracție (3.12) și se astupă balonul. Se agită amestecul pe agitator (4.1) timp de o noapte. Se lasă să se așeze 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000/p ml (p = conținutul nominal al preamestecului de diclazuril în mg/kg) din supernatant într-un balon cu fund rotund de dimensiuni adecvate. Se evaporă acest amestec până începe să se usuce, la presiune scăzută și la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator rotativ (4.3). Se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de DMF (3.6), se adaugă 15,0 ml apă (3.1) și se amestecă. Se efectuează dozajul prin CLHP (5.3).

5.3. Dozaj CLHP

5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu indicativ; se pot aplica și alte condiții dacă dau rezultate echivalente.

— Coloană cromatografică lichidă (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, umplută cu Hypersil ODS de 3 µm sau echivalent	
— Fază mobilă:	Eluant A (3.13.1):	soluție apoasă de acetat de amoniu și sulfat acid de tetrabutilamoniu
	Eluant B (3.13.2):	acetonitril
	Eluant C (3.13.3):	metanol

— Mod de eluare:	— gradient liniar
	— condiții inițiale: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
	— după 10 minute, eluare prin gradient timp de 30 min până când: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
	Se clătește cu B timp de 10 minute
— Debit:	1,5-2 ml/min
— Volum de injectare:	20 µl
— Lungimea undelor de detecție:	280 nm

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de etalonare (3.10) care conține 2 µg/ml, până se obțin înălțimi de vârf și timpi de reținere constanți.

5.3.2. Soluția de etalonare

Se injectează 20 µl din soluția de etalonare (3.10) de mai multe ori și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de diclazuril și de etalon intern.

5.3.3. Soluția probei

Se injectează 20 µl din soluția probei (5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de diclazuril și de etalon intern.

6. **Exprimarea rezultatelor**

6.1. Furaje

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

formulă în care:

$h_{d,s}$ = înălțimea (suprafața) vârfului de diclazuril din soluția probă (5.2.1)

$h_{i,s}$ = înălțimea (suprafața) vârfului etalonului intern din soluția probă (5.2.1)

$h_{d,c}$ = înălțimea (suprafața) vârfului de diclazuril din soluția de etalonare (3.10)

$h_{i,c}$ = înălțimea (suprafața) vârfului etalonului intern din soluția de etalonare (3.10)

$\delta_{d,c}$ = conținutul de diclazuril din soluția de etalonare în µg/ml (3.10)

m = masa porțiunii de probă în grame

V = volumul extractului din probă în conformitate cu 5.2.1 (adică 2,5 ml)

6.2. Preamestecuri

Conținutul de diclazuril w (mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

formulă în care:

$h_{d,c}$ = înălțimea (suprafața) vârfului de diclazuril din soluția de etalonare (5.2.2)

$h_{i,c}$ = înălțimea (suprafața) vârfului etalonului intern din soluția de etalonare (3.10)

$h_{d,s}$ = înălțimea (suprafața) vârfului de diclazuril din soluția de probă (5.2.2)

$h_{i,s}$ = înălțimea (suprafața) vârfului etalonului intern din soluția de probă (5.2.2)

$\delta_{d,c}$ = conținutul de diclazuril al soluției de etalonare (3.10)

m = masa porțiunii de probă în grame

V = volumul extractului din probă 5.2.2 (adică 25 ml)

p = conținutul nominal de diclazuril al preamestecului în mg/kg

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. *Identitate*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau cu ajutorul unui detector cu linii transversale de diode care permite compararea spectrelor extractului din probă (5.2.1 sau 5.2.2) și al soluției de etalonare (3.10).

7.1.1. Co-cromatografie

La un extract din probă (5.2.1 sau 5.2.2) se adaugă o cantitate adecvată din soluția de etalonare (3.10). Cantitatea de diclazuril adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de diclazuril constatată în extractul din probă.

Numai înălțimea vârfului de diclazuril și a vârfului etalonului intern trebuie să fie mărită ținându-se cont atât de cantitatea adăugată, cât și de diluția extractului. Lățimea vârfului la jumătatea înălțimii trebuie să se situeze la ± 10 % din lățimea inițială a vârfului de diclazuril sau a vârfului etalonului intern al extractului din proba care nu a fost suplimentată.

7.1.2. Detectarea prin liniile transversale de diode

Se evaluează rezultatele după următoarele criterii:

(a) lungimea de undă de absorbție maximă a spectrelor probei și etalonului, înregistrată la apexul vârfului pe cromatogramă, trebuie să se mențină într-o limită determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția prin linii transversale de diode, aceasta este în general de ± 2 nm;

(b) între 230 și 320 nm, spectrele probei și etalonului înregistrate la apexul vârfului cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași valori maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între cele două spectre nu depășește 15 % din absorbanța etalonului din analit.

(c) între 230 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale apexului și ale curbei descendente ale vârfului produse de extractul din probă nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași valori maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între spectre nu depășește 15 % din absorbanța spectrului apexului vârfului.

În cazul în care unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu se confirmă.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două dozaje paralele efectuate pe aceeași probă nu trebuie să depășească:

— 30 % din rezultatul superior pentru conținuturile de diclazuril situate între 0,5 și 2,5 mg/kg;

— 0,75 mg/kg pentru conținuturile de diclazuril situate între 2,5 și 5 mg/kg;

— 15 % din rezultatul superior pentru conținuturile de diclazuril mai mari de 5mg/kg

7.3. Recuperare

Pentru o probă suplimentară, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 80 %.

8. **Rezultatele unui studiu între laboratoare**

S-a realizat un studiu între laboratoare, în cursul căruia au fost analizate cinci probe de către 11 laboratoare. Aceste probe erau formate din două preamestecuri: unul era amestecat cu o matrice organică (O 100), iar celălalt cu o matrice anorganică (A 100). Conținutul teoretic este de 100 mg de diclazuril pe kg. Cele trei tipuri de hrană pentru păsări de curte erau fabricate de trei producători diferiți (NL) (L1/Z1/K1). Conținutul teoretic este de 1 mg de diclazuril pe kg. Laboratoarele primiseră instrucțiuni să analizeze fiecare probă o singură dată sau în duplicat. (Informații detaliate privind acest studiu între laboratoare figurează în *Journal of AOAC, vol. 77, nr. 6, 1994, p. 1359 – 1361).* Rezultatele studiului sunt prezentate în cele ce urmează:

	Proba 1 A 100	Proba 2 O 100	Proba 3 L 1	Proba 4 Z 1	Proba 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Medie	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
Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: număr de laboratoare.
n: număr de valori individuale.
s_r: devierea standard a repetabilității.
CV_r: coeficient de variație a repetabilității.
s_R: devierea standard a reproductibilității.
CV_R: coeficient de variație a reproductibilității.

9. **Observații**

Trebuie să se demonstreze în prealabil că reacția diclazurilului este liniară pentru toată gama de conținuturi măsurate.

PARTEA C

DOZAJUL CARBADOXULUI

Metil 3-(2-quinoxalinilmetilen)carbazat N^1, N^4-dioxid

1. **Obiect şi domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite dozarea carbadoxului din furaje, preamestecuri și preparate. Limita de detecție este de 1mg/kg; limita de dozare este de 10 mg/kg.

2. **Principiu**

Proba este echilibrată cu apă şi supusă unei extracții cu un amestec metanol/acetonitril. În cazul furajelor, o parte alicotă din extractul filtrat se curăță pe o coloană de oxid de aluminiu. Pentru preamestecuri și preparate, o parte alicotă din extractul filtrat se diluează la o concentrație adecvată cu apă, metanol și acetonitril. Conținutul de carbadox se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLHP) în fază inversată cu ajutorul unui detector UV.

3. **Reactivi**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, de calitate CLHP.

3.3. Acid acetic, w = 100 %.

3.4. Oxid de aluminiu: neutru, grad de activitate I.

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

Se amestecă 500 ml de metanol (3.1) cu 500 ml de acetonitril (3.2).

3.6. Acid acetic, σ = 10 %

Se diluează 10 ml de acid acetic (3.3) în 100 ml apă.

3.7. Acetat de sodiu, CH_3COONa.

3.8. Apă de calitate CLHP

3.9. Soluție tampon de acetat, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0

Se dizolvă 0,82 g acetat de sodiu (3,7) în 700 ml apă (3.8) și se reglează pH-ul la 6,0 cu acid acetic (3.6). Se transferă într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.8) și se amestecă.

3.10. Fază mobilă pentru CLHP

Se amestecă 825 ml de soluție tampon de acetat (3.9) cu 175 ml de acetonitril (3.2). Se trece compoziția printr-un filtru de 0,22 µm (4.5) și se degazează soluția (de exemplu prin tratarea cu ultrasunete timp de 10 minute).

3.11. Substanță etalon.

Carbadox pur: *metil 3-(2-quinoxalinilmetilen)carbazat N^1, N^4-dioxid*, E 850.

3.11.1. Soluția-mamă a etalonului de carbadox, 100 µg/ml (vezi punctul 5 Mod de operare)

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de carbadox (3.11) într-un balon gradat de 250 ml. Se dizolvă într-un amestec de metanol-acetonitril (3.5) prin tratare cu ultrasunete (4.7). După tratamentul ultrasonic, se aduce soluția la temperatura ambiantă, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Se înfășoară balonul într-o folie de aluminiu sau se utilizează un recipient din sticlă opacă și se pune la frigider. La o temperatură de ≤4 °C soluția este stabilă timp de o lună.

3.11.2. Soluții de etalonare

Se transferă 2,0, 5,0, 10,0 și 20,0 ml din soluția-mamă a etalonului (3.11.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se adaugă 30 ml apă, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Se înfășoară baloanele în folii de aluminiu. Aceste soluții corespund la 2,0, 5,0, 10,0, și respectiv 20,0 µg/ml de carbadox. Ele trebuie să fie reînnoite pentru fiecare folosire.

Notă: Pentru dozarea carbadoxului în hrana care conține mai puțin de 10 mg/kg, trebuie pregătite soluții de etalonare cu concentrații mai mici de 2,0 µg/ml.

3.12. Amestec apă-[metanol-acetonitril] (3.5), 300 + 700 (V + V)

Se amestecă 300 ml de apă cu 700 ml de amestec de metanol-acetonitril (3.5).

4. **Aparatură**

4.1. Agitator de laborator sau amestecător magnetic.

4.2. Hârtie filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalent).

4.3. Coloană de sticlă (lungime 300–400 mm, diametru intern aproximativ 10 mm), cu perete din sticlă sinterizată și valvă de evacuare

Notă: Este posibil, de asemenea, să se utilizeze o coloană de sticlă dotată cu un robinet sau o coloană de sticlă cu extremitatea îngustată; în acest caz, se inserează un tampon mic din vată de sticlă în extremitatea inferioară și se împinge cu ajutorul unei baghete de sticlă.

4.4. Echipament CLHP cu sistem de injecție, care permite injectarea de volume de 20 µl.

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C18, particule de 10 µm sau echivalent.

4.4.2. Detector UV de lungime de undă variabilă sau detector cu linii transversale de diode operând între 225 și 400 nm.

4.5. Filtru cu membrană de 0,22 µm.

4.6. Filtru cu membrană de 0,45 µm.

4.7. Baie ultrasonică.

5. **Mod de operare**

Notă: Carbadoxul este fotosensibil. Se operează totdeauna la lumină filtrată, sau se utilizează recipiente din sticlă opacă sau înfășurate în folie de aluminiu.

5.1. *Generalități*

5.1.1. Aliment probă

Pentru a efectua testul de recuperare (5.1.2), se analizează un aliment probă pentru a se verifica lipsa carbadoxului sau a substanțelor interferente. Alimentul probă trebuie să fie de același tip ca eșantionul; nu trebuie să se detecteze nici carbadox, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analizarea alimentului probă (5.1.1) la care a fost adăugată o cantitate de carbadox similară celei prezente în proba prelevată. Pentru obținerea unei concentrații de 50 mg/kg, se transferă 5,0 ml din soluția-mamă a etalonului (3.11.1) într-un balon conic de 200 ml. Se concentrează soluția prin evaporare la aproximativ 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 10 g din alimentul probă, se amestecă și se lasă 10 minute înainte de a trece la extracție (5.2).

Alternativ, în lipsa unui aliment probă de același tip ca cel al probei (vezi 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei prin adăugarea etalonului. În acest caz, proba de analizat este suplimentată cu o cantitate de carbadox asemănătoare celei deja prezente în probă. Aceasta este analizată împreună cu proba care nu a fost suplimentată și recuperarea poate fi calculată prin diferență.

5.2. *Extracția*

5.2.1. Furaje

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,01 g, aproximativ 10 g de probă și se transferă într-un balon conic de 200 ml. Se adaugă 15,0 ml apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 35,0 ml de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se supune timp de 30 minute unei agitări mecanice sau magnetice (4.1). Se trece soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2). Se conservă această soluție pentru faza de purificare (5.3).

5.2.2. Preamestecuri (0,1-2,0 %)

Se cântărește, cu o marjă de eroare de 0,001 g, aproximativ 1 g de probă neconcasată și se transferă într-un balon conic de 200 ml. Se adaugă 15,0 ml apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 35,0 ml de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se supune 30 de minute unei agitări mecanice sau magnetice (4.1). Se trece soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2). Se toarnă cu pipeta o parte alicotă din filtrat într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 15,0 ml apă, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Conținutul de carbadox al soluției finale trebuie să fie de aproximativ 10 µg/ml. O parte alicotă se trece printr-un filtru de 0,45 µm (4.6). Se trece la dozarea CLHP (5.4).

5.2.3. Preparate (> 2 %)

Se cântăresc, cu o marjă de eroare de 0,001 g, aproximativ 0,2 g de probă neconcasată și se transferă într-un balon conic de 250 ml. Se adaugă 45,0 ml apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 105,0 ml de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se omogenizează. Se supune proba ultrasunetelor (4.7) timp de 15 minute, apoi unei agitări mecanice sau magnetice timp de 15 minute (4.1). Se trece soluția printr-o hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2). Se diluează o parte alicotă din filtrat cu amestecul apă-metanol-acetonitril (3.12) până la o concentrație finală de carbadox de 10–15 µg/ml (pentru un preparat 10 %, factorul de diluție este 10). O parte alicotă se trece printr-un filtru de 0,45 µm (4.6). Se trece la dozarea CLHP (5.4).

5.3. *Purificare*

5.3.1. Prepararea coloanei de oxid de aluminiu.

Se cântăresc 4 g de oxid de aluminiu (3.4) și se transferă în coloana de sticlă (4.3).

5.3.2. Purificarea eșantionului

Se trec 15 ml din extractul filtrat (5.2.1) în coloana de oxid de aluminiu și se elimină primii doi ml de eluat. Se colectează următorii 5 ml și se trece o parte alicotă printr-un filtru de 0,45 µm (4.6). Se trece la dozarea CLHP (5.4).

5.4. *Dozare CLHP*

5.4.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu indicativ; se pot aplica și alte condiții dacă dau rezultate echivalente.

Coloană cromatografică lichidă (4.1.1):	300 mm × 4 mm, C18, particule de 10 µm sau echivalent.
Fază mobilă (3.10):	Amestec de soluție tampon de acetat (3.9) și de acetonitril (3.2), 825 + 175 (V + V).
Debit:	1,5-2 ml/min.
Lungimea undei de detecție:	365 nm.
Volumul injecției:	20 µl.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de etalonare (3.11.2) care conține 5,0 µg/ml, până se obțin înălțimi (suprafețe) ale vârfurilor și timpi de retenție constanți.

5.4.2. Curba de etalonare

Se injectează fiecare soluție de etalonare (3.11.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (suprafețele) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se stabilește o curbă de etalonare utilizând înălțimile sau suprafețele medii ale vârfurilor soluțiilor de etalonare ca ordonate și concentrațiile coresponzătoare în µg/l ca abscise.

5.4.3. Soluția probei

Se injectează extractul din probă [(5.3.2) pentru furaje, (5.2.2) pentru preamestecuri și (5.2.3) pentru preparate] de mai multe ori și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de carbadox.

6. **Exprimarea rezultatelor**

Plecând de la înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de carbadox ale soluției eșantionului, se determină conținutul soluției probei în µg/l prin referire la curba de etalonare (5.4.2).

6.1. Hrana pentru animale

Conținutul w de carbadox, exprimat în mg/kg, al probei este dat de formula următoare:

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

formulă în care:

δ = conținutul de carbadox al extractului din probă (5.3.2) în µg/ml.

V_1 = volumul de extracție în ml (adică 50 ml).

m = masa porției de probă în grame.

6.2. Preamestecuri și preparate

Conținutul w de carbadox, exprimat în mg/kg, al probei este dat de formula următoare:

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

formulă în care:

δ = conținutul de carbadox al extractului din probă (5.2.2 sau 5.3.2) în µg/ml.

V_2 = volumul de extracție în ml (adică 50 ml pentru preamestecuri și 150 ml pentru preparate).

f = factorul de diluție conform 5.2.2 (preamestecuri) sau 5.2.3 (preparate).

m = masa porției de probă în grame.

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau cu ajutorul unui detector cu linii transversale de diode care permite compararea spectrelor extractului din probă și soluției de etalonare (3.11.2) conținând 10,0 μg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

La un extract din probă se adaugă o cantitate adecvată din soluția de etalonare (3.11.2). Cantitatea de carbadox adăugată trebuie să fie similară cu cea evaluată în extractul din probă.

Numai înălțimea vârfului de carbadox trebuie să fie mărită, ținând cont în același timp de cantitatea adăugată și de diluția extractului. Lățimea vârfului la jumătatea înălțimii trebuie să se situeze la ± 10 % din lățimea inițială.

7.1.2. Detectarea prin liniile transversale de diode

Se evaluează rezultatele după următoarele criterii:

(a) lungimea de undă de absorbție maximă a spectrelor probei și etalonului, înregistrată la apexul vârfului pe cromatogramă, trebuie să se situeze între aceleași limite determinate de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția prin linii transversale de diode, ea este în general de ± 2 nm;

(b) între 225 și 400 nm, spectrele probei și etalonului înregistrate la apexul vârfului cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași valori maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între cele două spectre nu depășește 15 % din absorbanța etalonului analitului.

(c) între 225 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, al apexului și al curbei descendente ale vârfului produse de extractul din probă nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când aceleași valori maxime sunt prezente și când în nici un punct devierea observată între spectre nu depășește 15 % din absorbanța spectrului apexului vârfului.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. Repetabilitate

Pentru conținuturile de 10 mg/kg și mai mult, diferența dintre rezultatele a două dozaje paralele efectuate pe aceeași probă nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.

7.3. Recuperare

Pentru o probă suplimentară, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu între laboratoare**

S-a organizat un studiu între laboratoare, în cursul căruia au fost analizate șase tipuri de furaje, patru preamestecuri și trei preparate, în opt laboratoare. Pentru fiecare probă, analizele au fost efectuate în dublu. (Informații detaliate privind acest studiu între laboratoare figurează în *Journal of AOAC, vol. 71, 1988, p. 484 - 490)*. Rezultatele studiului (cu excepția valorilor aberante) sunt prezentate în cele ce urmează:

Tabelul 1. Rezultatele studiului între laboratoare efectuat pe furaje

	Proba 1	Proba2	Proba3	Proba4	Proba5	Proba6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Medie (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
Conținutul nominal (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabelul 2. Rezultatele studiului între laboratoare efectuat pe preamestecuri și preparate

	Preamestecuri				Preparate		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Medie (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
s_r (mg/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 (mg/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
Conținutul nominal (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: numărul de laboratoare.
n: numărul de valori individuale.
s_r: devierea standard a repetabilității.
CV_r: coeficientul de variație a repetabilității.
S_R: devierea standard a reproductibilității.
CV_R: coeficientul de variație a reproductibilității.