TWAALFDE RICHTLIJN 93/117/EG VAN DE COMMISSIE

van 17 december 1993

tot vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (1), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3768/85 (2), en met name op artikel 2,

Overwegende dat in Richtlijn 70/373/EEG is bepaald dat de officiële controle van diervoeders die tot doel heeft na te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van diervoeders gestelde eisen is voldaan, volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden wordt verricht;

Overwegende dat, om te controleren of de voorwaarden inzake het gebruik van robenidine en van methylbenzoquaat in diervoeders worden nageleefd, op communautair niveau voor deze additieven een analysemethode moet worden vastgesteld;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor diervoeders,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De Lid-Staten schrijven voor dat de analyses voor de officiële controle van diervoeders ten aanzien van het gehalte aan robenidine en methylbenzoquaat volgens de in de bijlage omschreven methoden worden uitgevoerd.

Artikel 2

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 30 november 1994 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de Lid-Staten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de Lid-Staten.

Artikel 3

Deze richtlijn treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen.*

Gedaan te Brussel, 17 december 1993.

Voor de Commissie
René STEICHEN
Lid van de Commissie

(1) PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.
(2) PB nr. L 362 van 31. 12. 1985, blz. 8.

BIJLAGE

1. BEPALING VAN ROBENIDINE

1,3-Bis[(4-chloorbenzylideen)amino]guanidine-hydrochloride

1. **Doel en toepassingsgebied**

Deze methode dient voor de bepaling van robenidine in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 5 mg/kg.

2. **Principe**

Het monster wordt met zure methanol geëxtraheerd. Het extract wordt gedroogd en een gedeelte ervan wordt gezuiverd over een aluminiumoxyde-kolom. Robenidine wordt met methanol van de kolom geëlueerd, geconcentreerd en tot een geschikt volume aangevuld met mobiele fase. Het gehalte aan robenidine wordt bepaald met reversed phase hoge-druk-vloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. **Reagentia**

3.1. *Methanol*

3.2. *Zure methanol*

Breng 4,0 ml zoutzuur (P_{20}, 1,18 g/ml) over in een maatkolf van 500 ml, vul aan tot de maatstreep met methanol (3.1) en meng. Deze oplossing dient voor gebruik vers te worden bereid.

3.3. *Acetonitril, HPLC-kwaliteit*

3.4. *Moleculaire zeef*

Korrels van type 3A, 8-12 mesh (korrels van 1,6-2,5 mm, kristallijn aluminosilicaat, poriediameter 0,3 nm)

3.5. *Aluminiumoxyde: zuur, activiteitsklasse I voor kolomchromatografie*

Breng 100 g aluminiumoxyde over in een geschikte kolf en voeg 2,0 ml water toe. Sluit de kolf af met een stop en schud de kolf ongeveer 20 minuten. In een goed afgesloten kolf bewaren.

3.6. *Kaliumdiwaterstoffosfaat-oplossing, c = 0,025 mol/l*

Los 3,40 g kaliumdiwaterstoffosfaat op in water (HPLC-kwaliteit) in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de streep met water en meng.

3.7. *Dinatriumwaterstoffosfaat-oplossing, c = 0,025 mol/l*

Los 3,55 g watervrij dinatriumwaterstoffosfaat (of 4,45 g dihydraat of 8,95 g dodecahydraat ervan) op in water (HPLC-kwaliteit) in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de streep met water en meng.

3.8. *Mobiele fase HPLC*

Meng de volgende reagentia met elkaar:

650 ml acetonitril (3.3)

250 ml water (HPLC-kwaliteit)

50 ml kaliumdiwaterstoffosfaat-oplossing (3.6)

50 ml dinatriumwaterstoffosfaat-oplossing (3.7)

Filtreer de oplossing door een filter van 0,22 µm (4.6) en ontgas de oplossing (bij voorbeeld door een ultrasoon-behandeling van 10 minuten)

3.9. *Standaardstof*

Zuiver robenidine: 1.3-bis[(4-chloorbenzylideen)amino]guanidinehydrochloride, E 758

3.9.1. Standaard-voorraadoplossing robenidine, 300 µg/ml

Weeg 30 mg robenidine-standaardstof (3.9) op 0,1 mg nauwkeurig af, los dit in een maatkolf van 100 ml op in zure methanol (3.2), vul aan tot de maatstreep en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar deze in het donker.

3.9.2. Standaard-tussenoplossing robenidine, 12 µg/ml

Breng 10,0 ml van de standaard-voorraadoplossing (3.9.1) over in een maatkolf van 250 ml, vul aan tot de maatstreep met de mobiele fase (3.8) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar deze in het donker.

3.9.3. IJkoplossingen

Breng in een reeks maatkolven van 50 ml respectievelijk 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 en 25,0 ml standaard-tussenoplossing (3.9.2). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.8) en meng. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 en 6,0 µg/ml robenidine. Deze oplossingen moeten voor gebruik vers worden bereid.

4. Apparatuur

4.1. *Glazen kolom*

Gemaakt van bruin glas, voorzien van een stop en een reservoir van ongeveer 150 ml inhoud; inwendige diameter 10-15 mm, lengte 250 mm.

4.2. *Laboratorium-schudapparaat (polsbeweging)*

4.3. *Rotatievacuümverdamper*

4.4. *HPLC-apparatuur met UV-detector met variabele golflengte of diode array detector; bereik 250-400 nm*

4.4.1. Vloeistofchromatografiekolom, 300 mm × 4 mm, C-18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom

4.5. *Glasvezelfilters* (Whatman GF/A of soortgelijk materiaal)

4.6. *Membraanfilters, 0,22 µm*

4.7. *Membraanfilters, 0,45 µm*

5. Werkwijze

NB: Robenidine is lichtgevoelig. Bij alle bewerkingen dient bruin glaswerk te worden gebruikt.

5.1. *Algemeen*

5.1.1. Een blanco diervoeder dient geanalyseerd te worden, om te controleren dat noch robenidine, noch storende stoffen aanwezig zijn.

5.1.2. De recovery dient bepaald te worden door middel van analyse van het blanco diervoeder (5.1.1) waaraan een vergelijkbare hoeveelheid robenidine is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 60 mg/kg wordt 3,0 ml standaard-voorraadoplossing (3.9.1) in een erlenmeyer van 250 ml gebracht. De oplossing wordt met een stroom stikstof tot ongeveer 0,5 ml ingedampt. Er wordt 15 g blanco diervoeder toegevoegd, gemengd en 10 minuten gewacht, alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Opmerking: Voor het doel van deze methode dient het blanco diervoerder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin bij analyse geen robenidine detecteerbaar te zijn.

5.2. *Extractie*

Weeg ongeveer 15 g van het voorbereide monster op 0,01 g nauwkeurig af. Breng het over in een erlenmeyer van 250 ml en voeg 100,0 ml zure methanol (3.2) toe; sluit de kolf af en schud 1 uur met het schudapparaat (4.2). Filtreer de oplossing door een glasvezelfilter (4.5) en vang het gehele filtraat op in een erlenmeyer van 150 ml. Voeg 7,5 g moleculaire zeef (3.4) toe, sluit de kolf af met een stop en schud 5 minuten. Filtreer onmiddellijk door een glasvezelfilter. Bewaar deze oplossing voor de zuiveringsstap (5.3).

5.3. *Zuivering*

5.3.1. Bereiding van de aluminiumoxyde-kolom

Breng een propje glaswol onderin een glazen kolom (4.1) en druk dit met een glazen staaf aan. Weeg 11,0 g bereid aluminiumoxyde (3.5) af en breng dit over in de kolom. Het aluminiumoxyde moet zo weinig mogelijk aan de atmosfeer worden blootgesteld. Klop zachtjes onderaan op de gevulde kolom zodat het aluminiumoxyde zich zet.

5.3.2. Zuivering monsterextract

Breng met een pipet 5,0 ml van het volgens 5.2 bereide monsterextract op de kolom. Houd de punt van de pipet dicht tegen de kolomwand en laat de oplossing door het aluminiumoxyde absorberen. Elueer het robenidine met 100 ml methanol (3.1) met een elutiesnelheid van 2-3 ml/min en vang het eluaat op in een rondbodemkolf van 250 ml. Damp de methanoloplossing droog aan de rotatievacuümverdamper (4.3) bij verminderde druk bij 40 °C. Los het residu weer op in 3-4 ml mobiele fase (3.8) en breng de oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml. Spoel de rondbodemkolf na met enkele porties van 1-2 ml mobiele fase en breng deze spoelvloeistof in de maatkolf over. Vul aan tot de maatstreep met dezelfde vloeistof en meng. Filtreer een gedeelte door een membraanfilter van 0,45 µm (4.7). Gebruik deze oplossing voor de HPLC-bepaling (5.4).

5.4. *HPLC-bepaling*

5.4.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad aangegeven, andere parameters mogen gebruikt worden onder voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

Vloeistofchromatografiekolom (4.4.1)

Mobiele fase HPLC (3.8)

Elutiesnelheid : 1,5 tot 2 ml/min

Detectiegolflengte : 317 nm

Injectievolume : 20 tot 50 µl.

Controleer de stabiliteit van het chromatografisch systeem door enige malen de ijkoplossing (3.9.3) met 3,6 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten (-oppervlakten) en retentietijden worden verkrgen.

5.4.2. IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.9.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogten (-oppervlakten). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.4.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.3.2) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt ; bepaal de gemiddelde robenidine piekhoogte (oppervlakte) van de robenidine pieken.

6. **Berekening van de resultaten**

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de robenidine pieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.4.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan robenidine w (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van de volgende formule :

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

waarin :

c = concentratie robenidine van de monsteroplossing in µg/ml

m = massa van de analyseportie in g.

7. **Validatie van de resultaten**

7.1. *Identiteit*

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door co-chromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract en de ijkoplossing (3.9.3) met 6,0 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Co-chromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.9.3) toe. De toegevoegde hoeveelheid robenidine moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid robenidine in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de robenidinepiek mag naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale hoogte moet binnen ± 10 % van de oorspronkelijke breedte liggen.

7.1.2. Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld :

a) De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesysteem. Voor diode array detectie is deze marge meestal ± 2 nm.

b) Tussen 250 en 400 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de twee spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van de standaard bedraagt.

c) Tussen 250 en 400 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

7.2. *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag bij robenidinegehalten van meer dan 15 mg/kg niet meer dan 10 % van het hoogste resultaat bedragen.

7.3. *Recovery*

Voor het blanco-monster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 85 % te bedragen.

8. **Resultaten van een ringonderzoek**

Door de EEG werd een ringonderzoek georganiseerd, waarin vier monsters kippevoeder en konijnevoeder, als voedermeel of in pelletvorm, door twaalf laboratoria werden onderzocht. Op elk monster werden duplo-analyses uitgevoerd. De resultaten zijn hieronder vermeld.

	Kippevoeder		Konijnevoeder	
	Meel	Pellet	Meel	Pellet
Gemiddeld mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_r (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Recovery (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid.
CV_r = variatie-coëfficiënt van de herhaalbaarheid
S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid
CV_R = variatie-coëfficiënt van de reproduceerbaarheid

2. BEPALING VAN METHYLBENZOQUAAT

7-Benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon

1. **Doel en toepassingsgebied**

Deze methode dient voor de bepaling van methylbenzoquaat in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 1 mg/kg.

2. **Principe**

Methylbenzoquaat wordt uit het monster geëxtraheerd met een oplossing van methaansulfonzuur in methanol. Het extract wordt gezuiverd met dichloormethaan, door middel van ionenwisselingschromatografie en daarna nogmaals met dichloormethaan. Het gehalte aan methylbenzoquaat wordt bepaald met reversed phase hoge-druk-vloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. **Reagentia**

3.1. *Dichloormethaan*

3.2. *Methanol, HPLC-kwaliteit*

3.3. *Mobiele fase HPLC*

Mengsel van methanol (3.2) en water (HPLC-kwaliteit) 75 + 25 (V + V).

Filtreer de oplossing door een filter van 0,22 µm (4.5) en ontgas de oplossing (bij voorbeeld door een ultrasoon-behandeling van 10 minuten).

3.4. *Methaansulfonzuur-oplossing,* σ = 2 %

Verdun 20,0 ml methaansulfonzuur met methanol (3.2) tot 1 000 ml.

3.5. *Zoutzuur,* σ = 10 %

Verdun 100 ml zoutzuur (P_{20} cd. 1,18 g/ml) met water tot 1 000 ml.

3.6. *Kationenwisselingshars Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh*

De hars wordt voor gebruik voorbehandeld : suspendeer 100 g hars in 500 ml zoutzuur (3.5) en breng het mengsel op een kookplaat onder voortdurend roeren aan de kook. Laat het mengsel afkoelen en decanteer het zuur. Filtreer de rest onder vacuüm door een filtreerpapier. Was de hars twee maal met telkens 500 ml water en vervolgens met 250 ml methanol (3.2). Spoel de hars met nog eens 250 ml methanol (3.2) en droog de filterkoek door overleiden van lucht. Bewaar de gedroogde hars in een afgesloten fles.

3.7. *Standaardstof: zuiver methylbenzoquaat (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon)*

3.7.1. Standaard-voorraadoplossing methylbenzoquaat, 500 µg/ml

Weeg 50 mg standaardstof (3.7) op 0,1 mg nauwkeurig af, los dit in een maatkolf van 100 ml op in methaansulfonzuur-oplossing (3.4), vul aan tot de maatstreep en meng.

3.7.2. Standaard-tussenoplossing methylbenzoquaat, 50 µg/ml

Breng 5,0 ml van de standaard-voorraadoplossing methylbenzoquaat (3.7.1) over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met methanol (3.2) tot de maatstreep en meng.

3.7.3. IJkoplossingen

Breng in een reeks maatkolven van 25 ml respectievelijk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 5,0 ml tussenstandaardoplossing methylbenzoquaat (3.7.2). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.3) en meng. Deze oplossingen hebben concentraties van respectievelijk 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 en 10,0 µg/ml methylbenzoquaat. Deze oplossingen moeten voor gebruik vers worden bereid.

4. **Apparatuur**

4.1. *Laboratorium-schudapparaat*

4.2. *Rotatievacuümverdamper*

4.3. *Glazen kolom (250 mm × 15 mm), voorzien van een stop en een reservoir van ongeveer 200 ml inhoud*

4.4. *HPLC-apparatuur met UV-detector met variable golflengte of diode array detector*

4.4.1. Vloeistofchromatografiekolom, 300 mm × 4 mm, C-18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom

4.5. *Membraanfilters, 0,22 µm*

4.6. *Membraanfilters, 0,45 µm*

5. **Werkwijze**

5.1. *Algemeen*

5.1.1. Een blanco diervoeder dient te worden geanalyseerd om te controleren dat er noch methylbenzoquaat, noch storende stoffen aanwezig zijn.

5.1.2. De recovery dient bepaald te worden door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid methylbenzoquaat is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 15 mg/kg wordt aan 20 g blanco diervoeder 600 µl standaard-voorraadoplossing (3.7.1) toegevoegd, gemengd en 10 minuten gewacht alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Opmerking: Voor het doel van deze methode dient het blanco diervoeder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin bij analyse geen methylbenzoquaat detecteerbaar te zijn.

5.2. *Extractie*

Weeg ongeveer 20 g van het voorbereide monster op 0,01 g nauwkeurig af en breng het over in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg 100,0 ml methaansulfonzuuroplossing (3.4) toe en schud 30 minuten (4.1). Filtreer de oplossing door een filtreerpapier en bewaar het filtraat voor de vloeistof-vloeistofverdelingsstap (5.3).

5.3. *Vloeistof-vloeistofverdeling*

Breng 25,0 ml van het bij (5.2) verkregen filtraat over in een scheitrechter van 500 ml die 100 ml zoutzuur (3.5) bevat. Voeg 100 ml dichloormethaan (3.1) in de scheitrechter toe en schud 1 minuut. Laat de fasen zich scheiden en laat de onderste laag (dichloormethaan) in een rondbodemkolf van 500 ml lopen. Herhaal de extractie van de waterfase met nog twee porties dichloormethaan van 40 ml en voeg de extracten bij het eerste extract in de rondbodemkolf. Damp het dichloormethaanextract droog bij 40 °C aan de rotatievacuümverdamper (4.2) onder verminderde druk. Los het residu op in 20-25 ml methanol (3.2), sluit de kolf af met een stop en bewaar het gehele extract voor ionenwisselingschromatografie (5.4).

5.4. *Ionenwisselingschromatografie*

5.4.1. Bereiding van de kationen-wisselingskolom

Breng een propje glaswol onderin een glazen kolom (4.3). Maak een suspensie van 5,0 g van de behandelde kationen-wisselingshars (3.6) met 50 ml zoutzuur (3.5), giet de suspensie in de glazen kolom en laat de hars bezinken. Laat de overmaat zuur tot net boven het oppervlak van de hars weglopen en spoel de kolom met water tot het afgetapte water met lakmoes neutraal reageert. Breng 50 ml methanol (3.2) op de kolom en laat deze doorlopen tot het oppervlak van de hars.

5.4.2. Kolomchromatografie

Breng het bij 5.3 verkregen extract met een pipet voorzichtig op de kolom. Spoel de rondbodemkolf met twee porties van 5-10 ml methanol (3.2) en breng de spoelvloeistof ook telkens op de kolom. Laat het extract tot het oppervlak van de hars doorlopen en spoel de kolom met 50 ml methanol (3.2), zodanig dat de elutiesnelheid niet meer dan 5 ml/min bedraagt. Verwerp de doorgelopen vloeistof. Elueer het methylbenzoquaat met 150 ml methaansulfonzuuroplossing (3.4) van de kolom en vang het eluaat op in een erlenmeyer van 250 ml.

5.5. *Vloeistof-vloeistofverdeling*

Breng het bij 5.4.2 verkregen eluaat over in een scheitrechter van 1 liter. Spoel de erlenmeyer met 5-10 ml methanol (3.2) en voeg de spoelvloeistof toe aan de inhoud van de scheitrechter. Voeg 300 ml zoutzuur (3.5) en 130 ml dichloormethaan (3.1) toe. Schud 1 minuut en laat de fasen scheiden. Laat de onderste laag (dichloormethaan) in een rondbodemkolf van 500 ml lopen. Herhaal de extractie van de waterfase met nog twee porties van 70 ml dichloormethaan en voeg deze extracten bij het eerste extract in de rondbodemkolf.

Damp het dichloormethaan-extract droog bij 40 °C aan de rotatievacuümverdamper onder verminderde druk. Los het residu in de kolf op in ongeveer 5 ml methanol (3.2) en breng deze oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml. Spoel de rondbodemkolf na met nog twee porties van 1-2 ml methanol en breng deze in de maatkolf over. Vul aan tot de maatstreep met methanol en meng. Een gedeelte wordt door een membraanfilter (4.6) gefiltreerd. Gebruik deze gefiltreerde oplossing voor de HPLC-bepaling (5.6).

5.6. *HPLC-bepaling*

5.6.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad aangegeven, andere parameters mogen gebruikt worden onder voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

Vloeistofchromatografiekolom (4.4.1)

Mobiele fase HPLC : mengsel van methanol en water (3.3)

Elutiesnelheid : 1 tot 1,5 ml/min

Detectiegolflengte : 265 nm

Injectievolume : 20 tot 50 µl.

Controleer de stabiliteit van het chromatografisch systeem door enige malen de ijkoplossing (3.7.3) met 4,0 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten (-oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.6.2. IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.7.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogten (-oppervlakten). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.6.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.5) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt ; bepaal de gemiddelde methylbenzoquaatpiekhoogte (oppervlakte) van de methylbenzoquaatpieken.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de methylbenzoquaatpieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.6.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan methylbenzoquaat w (mg/kg) van het monster wordt verkregen met behulp van de volgende formule :

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

waarin :

c = concentratie methylbenzoquaat van de monsteroplossing in µg/ml

m = massa van de analyseportie in g.

7. Validatie van de resultaten

7.1. *Identiteit*

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door co-chromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract en de ijkoplossing (3.7.3) met 10 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Co-chromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract een geschikte hoeveelheid van de standaard-tussenoplossing (3.7.2) toe. De toegevoegde hoeveelheid methylbenzoquaat moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid methylbenzoquaat in het monsterextract. Alleen de hoogte van de methylbenzoquaatpiek mag naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale hoogte moet binnen ± 10 % van de oorspronkelijke breedte liggen.

7.1.2. Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld :

a) De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesysteem. Voor diode array detectie is deze marge meestal ± 2 nm.

b) Tussen 220 en 350 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de twee spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van de standaard bedraagt.

c) Tussen 220 en 350 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

7.2. *Herhaalbaarheid*

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag bij methylbenzoquaatgehalten tussen 4 en 20 mg/kg niet meer dan 10 % van het hoogste resultaat bedragen.

7.3. *Recovery*

Voor het blanco-monster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 90 % te bedragen.

8. **Resultaten van een ringonderzoek**

Vijf monsters werden door tien laboratoria onderzocht. Op elk monster werden duplo-analyses uitgevoerd.

Resultaten

	Blanco	Meel 1	Pellet 1	Meel 2	Pellet
Gemiddeld (mg/kg)	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Recovery (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d. niet gedetecteerd

S_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid

CV_r = variatie-coëfficiënt van de herhaalbaarheid

S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV_R = variatie-coëfficiënt van de reproduceerbaarheid