31993L0117

L 329/54 *ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ* 30.12.1993

DVANÁCTÁ SMĚRNICE KOMISE 93/117/ES

ze dne 17. prosince 1993,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970, kterou se zavádějí metody odběru vzorků a analýzy Společenství pro úřední kontrolu krmiv [1], naposledy pozměněnou nařízením (EHS) č. 3768/85 [2], a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že směrnice 70/373/EHS stanoví, že se úřední kontroly krmiv, které mají potvrdit dodržování podmínek předepsaných právními a správními předpisy o kvalitě a složení krmiv, provádějí za použití metod Společenství pro odběr vzorků a analytických metod Společenství;

vzhledem k tomu, že je nutno stanovit analytické metody Společenství pro kontrolu dodržování podmínek při používání doplňkových látek robenidinu a methylbenzoátu v krmivech;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že při analýzách provedených v rámci úředních kontrol týkajících se obsahu robenidinu a methylbenzochátu v krmivech se používají metody popsané v příloze této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 30. listopadu 1994. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být za takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 3

Tato směrnice vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

V Bruselu dne 17. prosince 1993.

Za Komisi

René STEICHEN

člen Komise

[1] Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.
[2] Úř. věst. L 362, 31.12.1985, s. 8.

PŘÍLOHA

1. **STANOVENÍ ROBENIDINU**

1,3-bis [(4-chlorbenziliden) amino]guanidin hydrochlorid

1. **Účel a oblast působnosti**

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu robenidinu v krmivech. Mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje okyseleným methanolem. Extrakt se vysuší a jeho alikvotní část se přečistí na koloně s oxidem hlinitým. Robenidin se eluuje z kolony methanolem, koncentruje se a na vhodný objem se upraví pomocí mobilní fáze. Obsah robenidinu se stanoví vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi pomocí UV detektoru.

3. **Činidla**

3.1 *Methanol*

3.2 *Okyselený methanol*

Do 500 ml odměrné baňky se oměří 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové (P_{20}c, 1,18 g/ml), doplní se po značku methanolem (3.1.) a promíchá. Tento roztok musí být připraven těsně před použitím.

3.3 *Acetonitril, pro HPLC*

3.4 *Molekulární síto*

Typ 3A, 8 až 12 mesh (1,6–2,5 mm perličky krystalického hlinitokřemičitanu, průměr pórů 0,3 mm).

3.5 *Oxid hlinitý: kyselý, stupeň aktivity I pro kolonovou chromatografii*

100 g oxidu hlinitého se naváží do vhodné nádoby a přidají se 2 ml vody. Zazátkuje se a protřepává se přibližně 20 minut. Skladuje se v dobře zazátkované nádobce.

3.6 *Dihydrogen fosforečnan draselný, roztok c = 0,025 mol/l*

3,4 g dihydrogen fosforečnanu se rozpustí ve vodě (pro HPLC) v 1000 ml odměrné baňce, doplní se po značku a promíchá.

3.7 *Hydrogen fosforečnan sodný, roztok c = 0, 025 mol/l*

3,55 g bezvodého (nebo 4,45 g dihydrátu, nebo 8,95 g dodekahydrátu) hydrogen fosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (pro HPLC) v 1000 ml odměrné baňce. Doplní se po značku a promíchá.

3.8 *Mobilní fáze HPLC*

Smíchá se:

650 ml acetonitrilu (3.3.),

250 ml vody (pro HPLC),

50 ml roztoku dihydrogen fosforečnanu draselného (3.6.),

50 ml roztoku hydrogen fosforečnanu sodného (3.7.).

Zfiltruje se filtrem 0,22 μm (4.6.) a roztok se odplynní (např. ultrazvukem po dobu 10 minut).

3.9 *Standardní látka*

Čistý robenidin: 1.3-bis [(4-chlorbenziliden) amino] guanidin hydrochlorid, E 758.

3.9.1 Robenidin, základní standardní roztok: 300 µg/ml:

Naváží se 30 mg standardního látky robenidinu (3.9.) s přesností 0,1 mg. Rozpustí se v kyselém methanolu (3.2.) ve 100 ml odměrné baňce, doplní se po značku stejným rozpouštědlem a promíchá se. Baňka se obalí aluminiovou folií a uloží v temnu.

3.9.2 Robenidin, pracovní standardní roztok: 12 µg/ml

Odměří set 10,0 ml základního standardního roztoku (3.9.1) do 250 ml odměrné baňky, doplní po značku mobilní fází (3.8) a promíchá. Baňka se obalí aluminiovou folií a uloží v temnu.

3.9.3 Kalibrační roztoky

Do souboru 50 ml odměrných buněk se odměří 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 a 25.0 ml pracovního standardního roztoku (3.9.2.). Doplní se po značku mobilní fází (3.8.) a promíchá. Tyto roztoky odpovídají 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 a 6.0 µg/ml robenidinu. Všechny tyto roztoky se připravují těsně před použitím.

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 *Skleněná kolona*

Vyrobená z tmavého skla, vybavená uzavíracím kohoutem a nádržkou na přibližně 150 ml. Vnitřní průměr 10 – 15 mm, délka 250 mm.

4.2 *Ruční třepačka*

4.3 *Rotační odparka*

4.4 *Zařízení na vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) vybavené ultrafialovým detektorem s měnitelnou vlnovou délkou, anebo detektorem s diodovým polem, pracujícím v pásmu 250 - 400 mm*

4.4.1 *Kolona na kapalinovou chromatografii: 300 mm x 4 mm, C_{18}, 10 µm náplní nebo podobná.*

4.5 *Filtr ze skleněných vláken* (Whatman GF/A nebo podobný)

4.6 *Membránové filtry 0,22 µm*

4.7 *Membránové filtry 0,45 µm*

5. **Postup**

Pozn.: Robenidin je citlivý na světlo. Proto musí být při všech úkonech použito vždy nádobí z tmavého skla.

5.1 Obecně

5.1.1 Doporučuje se analyzovat modelové krmivo bez dávkovaného robenidinu a ověřit, zda neobsahuje robenidin ani jiné rušivé látky.

5.1.2 Je vhodné provést test výtěžnosti analýzou modelového krmiva (5.1.1.), do kterého bylo přidáno stejné množství robenidinu, jako je ve vzorku. K dosažení obsahu 60 mg/kg se do 250 ml Erlenmeyerovy baňky přidají 3 ml základního standardního roztoku (3.9.1.). Roztok se odpaří asi na objem 0,5 ml v proudu dusíku. Přidá se 15 g modelového krmiva, promíchá se a po deseti minutách se může začít s extrakcí (5.2.).

Pozn.: Pro účel této metody by mělo být modelové krmivo podobného typu jako je zkoušený vzorek a nemělo by obsahovat stanovitelné množství robenidinu.

5.2 *Extrakce*

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky se naváží přibližně 15 g upraveného vzorku s přesností 0,01 g, přidá se 100 ml okyseleného methanolu (3.2), zazátkuje a hodinu třepe na třepačce (4.2). Roztok se přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken (4.5) a celý objem filtrátu se jímá do 150 ml Erlenmeyerovy baňky. Přidá se 7,5 g molekulárního síta (3.4), zazátkuje a pět minut se třepe. Potom se ihned přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken. Tento roztok se použije k čištění (5.3).

5.3 *Čištění*

5.3.1 Příprava kolony s oxidem hlinitým

Do spodního konce skleněné kolony (4.1) se vloží malá zátka ze skelné vaty a utěsní se skleněnou tyčinkou. Naváží se 11,0 g připraveného kysličníku hlinitého (3.5) a nasype se do kolony, pokud možno s minimální časovou prodlevou v okolním prostředí. Oxid hlinitý se v naplněné koloně setřese lehkým poklepem na dolní konec kolony.

5.3.2 Čištění vzorku

Na připravenou kolonu se napipetuje 5,0 ml připraveného extraktu vzorku (5.2). Špička pipety se opře o stěnu kolony a extrakt se nechá řádně absorbovat oxidem hlinitým. Robenidin se z kolony eluuje pomocí 100 ml methanolu (3.1) při rychlosti průtoku 2 – 3 ml za minutu a eluát se jímá do 250 ml baňky s kulatým dnem. Methanolový roztok se za redukovaného tlaku a při teplotě 40°C odpaří do sucha v rotační odparce (4.3). Odparek se znovu rozpustí ve 3 – 4 ml mobilní fáze (3.8.) a kvantitativně se převede do 10 ml odměrné baňky. Baňka se několikrát vypláchne 1 – 2 ml mobilní fáze a tyto roztoky se přidají do odměrné baňky. Baňka se doplní po značku mobilní fází a promíchá se. Alikvotní část zfiltruje přes 0,45 µm filtr (4.7). Tento roztok se použije pro vlastní HPLC stanovení (5.4).

5.4 *Stanovení vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)*

5.4.1 Parametry

Následující podmínky jsou uvedeny indikativně. Mohou být použity i jiné pokud povedou ke stejným výsledkům:

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.4.1),

mobilní fáze (3.8),

průtoková rychlost: 1,5–2 ml/minuta,

vlnová délka detektoru: 317 nm,

objem nástřiku: 20–50 µl.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.9.3), který obsahuje 3,6 µg/ml, až do dosažení konstantních výšek píků a retenčních časů.

5.4.2 Kalibrační graf

Pro každý kalibrační roztok (3.9.3) se provede několik nástřiků a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se získá vynesením průměrných hodnot výšek nebo ploch píků proti odpovídajícím koncentracím kalibračních roztoků v µg/ml.

5.4.3 Roztok vzorku

Opakovaně se nastříkne stejný objem extraktu vzorku, jako při kalibraci a určí se průměrná hodnota výšky (plochy) píků robenidinu.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

Z průměrných hodnot výšek (ploch) robenidinových píků v roztoku vzorku se určí koncentrace robenidinu v roztoku vzorku v µg/ml odečtením z kalibračního grafu (5.4.2).

Obsah robenidinu „w“ (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

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

ve kterém je

c = koncentrace robenidinu v roztoku vzorku v µg/ml,

m = hmotnost navážky vzorku v gramech.

7. **Ověření výsledků**

7.1 *Identita*

Identita analytu analýzy může být potvrzena opakovaným stanovením s přídavkem anebo využitím detektoru s diodovým polem, který umožňuje porovnání spektra extraktu vzorku s kalibračním roztokem (3.9.3) obsahujícím 6 µg/ml robenidinu.

7.1.1 Opakované stanovení s přídavkem

K extraktu vzorku se přidá vhodného množství kalibračního roztoku (3.9.3). Množství přidaného robenidinu má být obdobné jako je předpokládaný obsah v extraktu vzorku.

Měla by se zvýšit pouze výška píku robenidinu podle množství přidaného robenidinu a obsahu robenidinu v naředěném extraktu. Šíře píku v polovině jeho maximální výšky musí být přibližně 10 % původní šíře.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky jsou vyhodnocovány podle následujících kritérií:

a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s nepřesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává plus/minus 2 nm;

b) při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí záznam spektra zkoušeného vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže nikde odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu.

c) při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí spektrum vzestupu, vrcholu a sestupu píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže není dosaženo některého z těchto kritérií, přítomnost analytu není prokázána.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí přesáhnout 10 % relat. nejvyššího výsledku při obsahu robenidinu nad 15 mg/kg.

7.3 *Výtěžnost*

Výtěžnost pro fortifikovaný vzorek musí být nejméně 85 %

8. **Výsledky kruhového testu**

Společenství zorganizovalo kruhový test, ve kterém dvanáct laboratoří analyzovalo čtyři vzorky krmiv pro drůbež a králíky, sypkých nebo peletovaných. Každý ze vzorků byl podroben dvěma stanovením. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Drůbež		králíci	
	Sypké krmivo	Pelety	Sypké krmivo	Pelety
Průměr (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
Výtěžnost (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr = standardní odchylka opakovatelnosti
CV_r = variační koeficient opakovatelnosti
S_R = standardní odchylka v reprodukovatelnosti
CV_R = variační koeficient v reprodukovatelnosti

2. STANOVENÍ METHYLBENZOCHÁTU

(2-methyl-7-benzyl-oxy-6-butyl-1,4-dihydro-4-oxychinolin-3-karboxylát)

1. Účel a oblast použití

Tato metoda slouží k určování methylbenzochátu v krmivech. Dolní mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

2. Princip

Methylbenzochát je extrahovan ze vzorku pomocí methanolového roztoku kyseliny methansulfonové. Extrakt je přečištěn dichlormethanem, ionexovou chromatografií, a následně pak znovu dichlormethanem. Obsah methylbenzochátu se stanoví na reverzní fází vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) pomocí UV detektoru.

3. Činidla

3.1 Dichlormethan

3.2 Methanol, pro HPLC

3.3 Mobilní fáze HPLC

Směs methanolu (3.2.) a vody (pro HPLC) 75 + 25 (obj.).

Přefiltruje se přes 0,22 μm filtr (4.5.) a odplyní (např. ultrazvukem po dobu 10 minut).

3.4 Roztok kyseliny methansulfonové σ = 2 %

20 ml kyseliny methansulfonové se rozředí v 1000 ml methanolu (3.2.).

3.5 Roztok kyseliny chlorovodíkové σ = 10 %

100 ml kyseliny chlorovodíkové (P20 c. 1,18g/ml) se rozředí v 1000 ml vody.

3.6 Katex CG-120 (Na), 100 – 200 mesh

Před použitím se upravuje katex takto: 100 g iontoměniče se rozmíchá v 500 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3,5) a za stálého míchání se zahřívá k varu na topné desce. Po vychladnutí se kyselina dekantuje. Filtruje se přes papírový filtr za sníženého tlaku. Ionex se propláchne dvakrát vždy 500 ml vody a potom 250 ml methanolu (3.2). Potom se propláchne dalšími 250 ml methanolu a vysuší prosáváním vzduchu přes filtrační koláč. Vysušený ionex se uskladňuje v zazátkované lahvi.

3.7 Standardní látka: čistý methylbenzochát (2-methyl-7-benzyl-oxy-6-butyl-1,4-dihydro-4-oxychinolin-3-karboxylát)

3.7.1 Základní standardní roztok benzochátu, 500 μg/ml

Naváží se 50 mg standardní látky (3.7) s přesností 0,1 mg, rozpustí se ve 100 ml odměrné baňce v roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), doplní po značku a promíchá.

3.7.2 Pracovní standardní roztok methylbenzochátu 50μg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku methylbenzochátu (3.7.1), doplní se methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.7.3 Kalibrační roztoky

Do série 25 ml odměrných baněk se odpipetuje 1, 2, 3, 4 a 5 ml pracovního standardního roztoku methylbenzochátu (3.7.2). Doplní se po značku mobilní fází (3.3) a zamíchá. Tyto roztoky mají koncentrace 2, 4, 6, 8 a 10 μg/ml methylbenzochátu. Kalibrační roztoky se musí připravovat těsně před jejich použitím.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Laboratorní třepačka

4.2 Rotační odparka

4.3 Skleněná kolona (250 x 15 mm) vybavená uzavíracím kohoutkem a nádržkou s kapacitou 200 ml

4.4 HPLC zařízení vybavené UV detektorem s měnitelnou vlnovou délkou nebo detektorem diodovým polem

4.4.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii: 300 mm x 4 mm, C – 18, 10μm nebo kolona podobná

4.5 Membránové filtry 0,22 μm

4.5 Membránové filtry 0,45μm

5. **Postup**

5.1 *Obecně*

5.1.1 Modelové krmivo bez dávkovaného methylbenzochátu se musí analyzovat a přezkoušet zda v něm není přítomen ani methylbenzochát ani jiné rušivé látky.

5.1.2 Musí se provést test výtěžnosti analýzou modelového krmiva, fortifkovaného methylbenzochátem v obdobném množství, jaké je obsaženo ve vzorku. K fortifikaci na úroveň 1,5 mg/kg se přidá do 20 g modelového krmiva 600 μl základního standardního roztoku (3.7.1), promíchá se a po 10 minut se započne s extrakcí (5.2).

Pozn.: Modelové krmivo pro tento účel by mělo být podobného typu, jako je vzorek, a při jeho analýze by neměl být zjištěn methylbenzochát.

5.2 *Extrakce*

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky se naváží přibližně 20 g připraveného vzorku s přesností 0,01 g. Přidá se 100 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4) a mechanicky se třepe (4.1) po dobu 30 minut. Roztok se zfiltruje přes papírový filtr a filtrát použije na extrakci kapalina-kapalina (5.3).

5.3 *Extrakce kapalina-kapalina*

Do 500 ml dělící nálevky, obsahující 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.5) se přidá 25 ml filtrátu, který byl získán postupem uvedeným v bodu (5.2). Dále se do nálevky přidá 100 ml dichlormethanu (3.1) a třepe po dobu jedné minuty. Potom se nechají vrstvy separovat a spodní vrstva (dichlormethanu) se odpustí do 500 ml baňky s kulatým dnem. Extrakce vodné fáze se opakuje se dvěma dalšími 40 ml dávkami dichlormethanu a tyto se spojí s prvním extraktem v baňce s kulatým dnem. Extrakt dichlormethanu se odpaří do sucha na rotační odparce (4.2) při sníženém tlaku a teplotě 40 °C. Odparek se rozpustí v 20–25 ml methanolu (3.2), baňka se zazátkuje a celý extrakt se použije pro chromatografii s iontovou výměnou (5.4).

5.4 *Chromatografie výměnou iontů*

5.4.1 Příprava ionexové kolony

Do dolního konce skleněné kolony (4.3) se vloží tampon ze skelné vaty. Připraví se suspense z 5 g upraveného katexu a z 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5). Tato směs se nalije do skleněné kolony a nechat usadit. Přebytečná kyselina se odpustí až těsně nad hladinu iontoměniče a kolona se promývá vodou dokud proteklý eluát není neutrální na lakmusový papír. Potom se do kolony se nalije 50 ml methanolu (3.2) a nechá se stéci až k povrchu ionexu.

5.4.2 Kolonová chromatografie

Na kolonu se opatrně napipetuje získaný extrakt (5.3). Baňka s kulatým dnem se vypláchne dvěma dávkami 5 až 10 ml methanolu (3.2) a výplach se také převede na kolonu. Extrakt se nechá stéci až k povrchu ionexu. Kolona se promyje 50 ml methanolu tak, aby průtok nepřesahoval 5 ml za minutu. Proteklá kapalina se odstraní. Methylbenzochát se eluuje z kolony 150ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4) a eluát se jímá do 250 ml Erlenmeyerovy baňky.

5.5 *Extrakce kapalina-kapalina*

Získaný eluát (5.4.2) se převede do jednolitrové dělící nálevky. Erlenmeyerova baňka se propláchne 5 až 10 ml methanolu (3.2) a výplach se přidá do dělící nálevky. Dále se do dělící nálevky přidá 300 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.5) a 130 ml dichlormethanu (3.1). Třepe se po dobu jedné minuty a potom se nechají fáze odseparovat. Nižší (dichlormethanová) vrstva se odpustí do 500 ml baňky s kulatým dnem. Extrakce vodné fáze se opakuje se dvěma dalšími 70 ml dávkami dichlormethanu a tyto extrakty se smísí s prvním extraktem v baňce s kulatým dnem.

Extrakt dichlormethanu se odpaří do sucha v rotační odparce (4.2) při sníženém tlaku a teplotě 40 °C. Odparek v baňce se rozpustí v přibližně 5 ml methanolu (3.2) a tento roztok se kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se vypláchne dvěma dalšími dávkami 1 až 2 ml methanolu a opět se převede do odměrné baňky. Baňka se doplní po značku methanolem a promíchá. Alikvotní množství se přefiltruje přes membránový filtr (4.6). Tento roztok se použije pro analýzu HPLC (5.6).

5.6 *Analýza pomocí HPLC*

5.6.1 Parametry

Následující podmínky jsou uvedeny indikativně. Mohou být použity jiné parametry pokud povedou ke stejným výsledkům:

— kolona pro kapalinovou chromatografii (4.4.1),

— mobilní fáze: směs methanolu a vody,

— průtoková rychlost: 1–1,5 ml/minuta,

— vlnová délka detektoru: 265 nm,

— objem nástřiku: 20 až 50µl.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.7.3) obsahujícího 4µg/ml, až do dosažení konstantních výšek nebo ploch píků a retenčních časů.

5.6.2 Kalibrační graf

Pro každý kalibrační roztok (3.7.3) se provede několik nástřiků a změří výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se získá vynesením průměrných hodnot výšek nebo ploch píků proti koncentracím kalibračních roztoků v µg/ml.

5.6.3 Roztok vzorku

Opakovaně se nastříkne extrakt vzorku (5.5.) s použitím stejný objem, jaký byl použit pro kalibrační roztoky a určí průměrná hodnota výšky (plochy) z píků methylbenzochátu.

6. **Výpočet výsledků**

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píků methylbenzochátu v roztoku vzorku se určí koncentrace v roztoku vzorku v µg/ml podle kalibračního grafu (5.6.2.).

Obsah methylbenzochátu w (mg/kg) ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce

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

ve kterém je

c = koncentrace methylbenzochátu v roztoku vzorku v µg/ml,

m = hmotnost navážky vzorku v gramech.

7. **Ověření správnosti výsledků**

7.1 *Identita*

Identita analytu může být potvrzena opakovaným stanovením s přídavkem anebo využitím detektoru s diodovým polem, který umožňuje porovnání spektra extraktu vzorku s kalibračním roztokem (3.7.3.), obsahujícím 10 µg/ml methylbenzochátu.

7.1.1 Opakované stanovením s přídavkem

Extrakt vzorku se fortifikuje přidáním vhodného množství pracovního standardního roztoku (3.7.2.). Množství přidaného methylbenzochátu má být podobné jako je předpokládaný obsah methylbenzochátu v extraktu vzorku.

Mělo by dojít pouze ke zvýšení píku methylbenzochátu s ohledem jak na přidané množství, tak na množství metylbenzochátu ve zředěném extraktu. Šíře píku v polovině maximální výšky musí být na přibližně 10 % původní šíře.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky jsou vyhodnocovány podle následujících kritérií:

a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s nepřesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává plus/minus 2 nm;

b) při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí záznam spektra zkoušeného vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže nikde odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu;

c) při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí spektrum vzestupu, vrcholu a sestupu píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních v této částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže není dosaženo některého z těchto kritérií, přítomnost analytu není prokázána.

7.2 *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí přesáhnout 10 % vzhledem k nejvyššímu výsledku při obsahu methylbenzochátu mezi 4 a 20 mg/kg.

7.3 *Výtěžnost*

Výtěžnost pro fortifikovaný vzorek musí být nejméně 90 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

V deseti laboratořích bylo analyzováno pět vzorků. U každého vzorku byly provedeny dvě analýzy.

Výsledky

	Modelové krmivo	Sypké krmivo	Pelety	Sypké krmivo	Pelety
Průměr (mg/kg)	Nezjištěno	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
Výtěžnost (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

S_r = standardní odchylka opakovatelnosti
CV_r = variační koeficient opakovatelnost
S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti
CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti