31993L0117

DVANAJSTA DIREKTIVA KOMISIJE 93/117/ES
z dne 17. decembra 1993
o uvedbi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (EGS) št. 3768/85 ([2]), in zlasti člena 2 Direktive,

ker Direktiva 70/373/EGS zahteva, da se uradni nadzor krme za preverjanje skladnosti z zahtevami iz določb o kakovosti in sestavi, določenih v zakonu ali drugem predpisu, izvaja z metodami vzorčenja in analiz Skupnosti;

ker je treba uvesti analitski metodi Skupnosti za dodatka robenidin in metil benzokvat za preverjanje skladnosti s pogoji uporabe v krmi;

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

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se analize za uradni nadzor krme na vsebnost robenidina in metil benzokvata izvajajo z metodama, opisanima v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 30. novembra 1994. O tem takoj obvestijo Komisijo.

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

Člen 3

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

V Bruslju, 17. decembra 1993

Za Komisijo
René STEICHEN
Član Komisije

([1]) UL L 170, 3.8.1970, str. 2.
([2]) UL L 362, 31.12.1985, str. 8.

PRILOGA

1. **DOLOČANJE ROBENIDINA**

1,3-bis[(4-chlorobenzylidene)amino] guanidine-hidrochloride

1. **Namen in področje uporabe**

S to metodo se določa robenidin v krmi. Spodnja meja določanja je 5 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorec ekstrahiramo z nakisanim metanolom. Ekstrakt osušimo in alikvot prečistimo na koloni iz aluminijevega oksida. Robenidin eluiramo s kolone z metanolom, koncentriramo in dopolnimo do ustreznega volumna z mobilno fazo. Vsebnost robenidina določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in UV-detektorjem.

3. **Reagenti**

3.1 *Metanol*

3.2 *Nakisani metanol*

4,0 ml klorovodikove kisline ($P_{20}c$, 1,18 g/ml) prenesemo v 500-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo do oznake z metanolom (3.1) in premešamo. Raztopino pred vsako uporabo sveže pripravimo.

3.3 *Acetonitril, za HPLC*

3.4 *Molekularno sito*

Tip 3A, kroglice 8 do 12 meš (1,6 – 2,5 mm kroglice, kristalinični alumo-silikat, premer por 0,3 mm)

3.5 *Aluminijev oksid: stopnja kislinske aktivnosti I, za kolonsko kromatografijo*

V primerno posodo prenesemo 100 g aluminijevega oksida in dodamo 2,0 ml vode. Zamašimo in stresamo približno 20 minut. Hranimo v dobro zaprti posodi.

3.6 *Raztopina kalijevega dihidrogenfosfata, c = 0,025 mol/l*

Raztopimo 3,40 g kalijevega dihidrogenfosfata v vodi (za HPLC) v 1 000-mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.7 *Raztopina di-natrijevega hidrogenfosfata, c = 0,025 mol/l*

Raztopimo 3,55 g brezvodnega (ali 4,45 g dihidrata ali 8,95 g dodekahidrata) di-natrijevega hidrogenfosfata v vodi (za HPLC) v 1 000-mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.8 *HPLC-mobilna faza*

Zmešamo naslednje reagente:

650 ml acetonitrila (3.3),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml raztopine kalijevega di-hidrogenfosfata (3.6),

50 ml raztopine di-natrijevega hidrogenfosfata (3.7).

Filtriramo skozi 0,22 µm filter (4.6) in razplinimo raztopino (npr. v ultrazvočni kopeli 10 min).

3.9 *Standardna substanca*

Čisti robenidin: 1,3-bis[4-chlorobenzylidene)amino] guanidine hydrochloride, E 750.

3.9.1 Osnovna standardna raztopina robenidina: 300 µg/ml:

Natehtamo 30 mg standardne substance robenidina (3.9) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v nakisanem metanolu (3.2) v 100-mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake z istim topilom in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo in jo hranimo v temi.

3.9.2 Vmesna standardna raztopina robenidina: 12 µg/ml

10 ml osnovne standardne raztopine robenidina (3.9.1) prenesemo v 250-mililitrsko merilno bučko, napolnimo do oznake z mobilno fazo (3.8) in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo in hranimo v temi.

3.9.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50-mililitrskih merilnih bučk prenesemo 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 in 25,0 ml vmesne standardne raztopine (3.9.2). Z mobilno fazo (3.21) dopolnimo do oznake in premešamo. Te raztopine ustrezajo koncentracijam 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 in 6,0 µg/ml robenidina. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

4. **Oprema**

4.1 *Steklena kolona*

Iz temnega stekla, s petelinčkom in rezervoarjem s kapaciteto približno 150 ml, notranji premer 10 do 15 mm, dolžina 250 mm.

4.2 *Laboratorijski stresalnik*

4.3 *Rotacijski uparjalnik*

4.4 *Oprema HPLC z ultravijoličnim detektorjem ali detektorjem s serijo diod, z nastavljivo valovno dolžino v območju od 250 do 400 nm*

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm × 4 mm, C_{18}, polnitev 10 µm ali enakovredna

4.5 *Filtrski papir iz steklenih vlaken (Whatman GF/A ali enakovreden)*

4.6 *Membranski filtri, 0,22 µm*

4.7 *Membranski filtri, 0,45 µm*

5. **Postopek**

Opomba: Robenidin je občutljiv na svetlobo. Pri vseh operacijah moramo uporabljati temno steklovino.

5.1 *Splošno*

5.1.1 Slepo krmo je treba z analizo preveriti, da ni prisoten niti robenidin niti moteče substance.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki ji je bila dodana količina robenidina, podobna količini v vzorcu. Za obogatitev na vrednost 60 mg/kg prenesemo 3,0 ml osnovne standardne raztopine (3.9.1) v 250-mililitrsko erlenmajerico in jo uparimo v toku dušika do približno 0,5 ml, dodamo 15 g slepe krme, premešamo in počakamo 10 min, preden začnemo s postopkom ekstrakcije (5.2).

Opomba: Za namen te metode mora biti slepa krma podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati robenidina.

5.2 *Ekstrakcija*

Natehtamo približno 15 g pripravljenega vzorca s točnostjo 0,01 g. Prenesemo v 250-mililitrsko erlenmajerico in dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.2), zamašimo in stresamo eno uro na stresalniku (4.2). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.5) v 150-mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 7,5 molekularnega sita (3.4), zamašimo in stresamo pet minut. Takoj filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken. Raztopino zadržimo za fazo čiščenja (5.3).

5.3 *Čiščenje*

5.3.1 Priprava kolone z aluminijevim oksidom

V spodnji del steklene kolone vstavimo zamašek iz steklene volne (4.1) in ga potlačimo s stekleno palčko. Natehtamo 11,0 g pripravljenega aluminijevega oksida in ga prenesemo v kolono. Pazimo, da je pri tem postopku čim manj izpostavljen atmosferi. Rahlo udarjamo po spodnjem delu polne kolone, da se aluminijev oksid sesede.

5.3.2 Čiščenje vzorca

Na kolono s pipeto prenesemo 5,0 ml ekstrakta vzorca, pripravljenega v (5.2). Pipeto naslonimo na steno kolone in pustimo, da se raztopina absorbira na aluminijevem oksidu. Robenidin eluiramo iz kolone s 100 ml metanola (3.1) s hitrostjo pretoka 2 do 3 ml/min in eluat lovimo v 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Metanolno raztopino uparimo do suhega pri znižanem tlaku pri 40 °C v rotacijskem uparjalniku (4.3). Ostanek raztopimo v 3 do 4 ml mobilne faze (3.8) in ga kvantitativno prenesemo v 10-mililitrsko merilno bučko. Bučko nekolikokrat speremo z 1 do 2 ml mobilne faze, ki ju prenesemo v merilno bučko. Napolnimo do oznake z istim topilom in premešamo. Alikvot filtriramo skozi 0,45 µm (4.7). S to raztopino izvedemo HPLC-določitev (5.4).

5.4 *HPLC-določitev*

5.4.1 Parametri

Navedeni pogoji so podani kot vodila, uporabimo lahko tudi druge pogoje, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)

HPLC-mobilna faza (3.8)

Hitrost pretoka: 1,5 – 2 ml/min.

Valovna dolžina detekcije: 317 nm

Volumen vbrizga: 20 do 50 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umeritev (3.9.3), ki vsebuje 3,6 µg/ml, dokler ne dobimo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

5.4.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo raztopino za umerjanje (3.9.3) in merimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.3.2), uporabljajoč enake volumne, kakor smo jih uporabili pri raztopini za umerjanje, in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina.

6. **Izračun rezultatov**

Koncentracijo raztopine vzorca v µg/ml določimo iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina iz umeritvene krivulje (5.4.2).

Vsebnost robenidina w (mg/kg) v vzorcu je podana z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

c = koncentracija robenidina v raztopini vzorca, v µg/ml,

m = masa preskusnega vzorca, v gramih.

7. **Validacija rezultatov**

7.1 *Identiteta*

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, pri čemer primerjamo spekter ekstrakta vzorca (3.9.3) in raztopine za umerjanje, ki vsebuje 6,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom primerne množine raztopine za umeritev (3.9.3). Množina dodanega robenidina mora biti podobna ocenjeni množini robenidina, prisotni v ekstraktu vzorca.

Povišana je lahko le višina vrha robenidina, potem ko smo upoštevali tako dodano množino kakor tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove največje višine mora biti v mejah približno 10 % prvotne širine.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednje kriterije:

(a) Valovna dolžina največje absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha kromatograma, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diod je to ponavadi v območju približno ± 2 nm;

(b) Med 250 in 400 nm se spektri vzorca in standarda na najvišji točki kromatografskega vrha v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja od 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in razlika med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) Med 250 in 400 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eden od teh kriterijev ni izpolnjen, prisotnost analita ni bila potrjena.

7.2 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki se izvedeta na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % od višjega rezultata za vsebnost robenidina nad 15 mg/kg.

7.3 *Izkoristek*

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 85 %.

8. **Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije**

V Skupnosti je bila organizirana medlaboratorijska primerjalna študija štirih vzorcev perutninske in kunčje krme v prahu in briketih, ki so bili analizirani v dvanajstih laboratorijih. Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat. Rezultati so zbrani v spodnji preglednici:

	Perutnina		Kunci	
	Moka	Briketi	Moka	Briketi
Srednja vrednost mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
Sr (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CVr (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
SR (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Obnovitev (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr = standardni odmik ponovljivosti.
CVr = koeficient variacije ponovljivosti
SR = standardni odmik obnovljivosti
CV_R = koeficient variacije obnovljivosti

2. DOLOČANJE METIL BENZOKVATA

7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-quinolon

1. **Namen in področje uporabe**

Z opisano metodo se določa metil benzokvat v krmi. Spodnja meja določanja je 1 mg/kg.

2. **Princip**

Metil benzokvat ekstrahiramo iz vzorca z raztopino metanol metansulfonske kisline. Ekstrakt prečistimo z diklorometanom z ionsko izmenjalno kromatografijo, nato ponovno z diklorometanom. Vsebnost metil benzokvata določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in UV-detektorjem.

3. **Reagenti**

3.1 *Diklorometan*

3.2 *Metanol, za HPLC*

3.3 *HPLC-mobilna faza*:

mešanica metanola (3.2) in vode (za HPLC) 75 + 25 (v + v).

Filtriramo skozi 0,22 μm filter (4.5) in razplinimo raztopino (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli).

3.4 *Raztopina metansulfonske kisline, σ = 2 %*

Razredčimo 20,0 ml metansulfonske kisline do 1 000 ml z metanolom (3.2).

3.5 *Raztopina klorovodikove kisline, σ = 10 %*

Razredčimo 100 ml klorovodikove kisline (P_{20} c. 1,18 g/ml) do 1 000 ml z vodo.

3.6 *Kationsko izmenjalna smola amberlit CG-120 (Na), 100 do 200 meš*

Smolo pred uporabo obdelamo: 100 g smole suspendiramo v 500 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5) in med neprestanim mešanjem segrejemo na vroči plošči do vrenja. Ohladimo in oddekantiramo kislino. Filtriramo skozi papirni filter pod vakuumom. Dvakrat speremo smolo s po 500 ml vode, nato z 250 ml metanola (3.2). Nato jo še enkrat speremo z 250 ml metanola in osušimo z zrakom, ki prehaja skozi filtrirano pogačo. Suho smolo hranimo v zaprti steklenici.

3.7 *Standardna substanca: čisti metil benzokvat (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-quinolon)*

3.7.1 Standardna osnovna raztopina metil benzokvata, 500 μg/ml

Natehtamo s točnostjo 0,1 mg 50 mg standardne substance (3.7), raztopimo v metansulfonski kislini (3.4) v 100-mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.7.2 Vmesna standardna raztopina metil benzokvata: 50 μg/ml

5,0 ml osnovne standardne raztopine metil benzokvata (3.7.1) prenesemo v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo do oznake z metanolom (3.2) in premešamo.

3.7.3 Umeritvene raztopine

V serijo 25-mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 in 5,0 ml vmesne standardne raztopine metil benzokvata (3.7.2). Dopolnimo do oznake z mobilno fazo (3.3) in premešamo. Te raztopine imajo koncentracije 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 in 10,0 μg/ml metil benzokvata. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

4. **Oprema**

4.1 *Laboratorijski stresalnik*

4.2 *Rotacijski uparjalnik*

4.3 *Steklena kolona (250 mm × 15 mm) s petelinčkom in kapaciteto rezervoarja približno 200 ml.*

4.4 *HPLC-oprema z ultravijoličnim detektorjem z nastavljivo valovno dolžino ali detektorjem s serijo diod*

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm × 4 mm, C-18, polnitev 10 µm ali enakovredna

4.5 *Membranski filtri, 0,22 µm*

4.6 *Membranski filtri, 0,45 µm*

5. **Postopek**

5.1 *Splošno*

5.1.1 Slepo krmo je treba z analizo preveriti, da nista prisotna niti metil benzokvat niti moteče substance.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo ji dodali metil benzokvat v količini, podobni količini metil benzokvata v vzorcu. Za obogatitev na vsebnost 15 mg/kg dodamo 600 µl osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 20 g slepe krme, premešamo in počakamo 10 minut, preden nadaljujemo s postopkom ekstrakcije (5.2).

Opomba: Po tej metodi mora biti slepa krma podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati metil benzokvata.

5.2 *Ekstrakcija*

Natehtamo približno 20 g pripravljenega vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 250-mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 100,0 ml raztopine metansulfonske kisline (3.4) in mehansko (4.1) stresamo 30 minut. Raztopino filtriramo skozi papirni filter in ohranimo filtrat za postopek ločevanja tekočina-tekočina (5.3).

5.3 *Ločevanje tekočina-tekočina*

V 500-mililitrski lij ločnik, v katerem je 100 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5), prenesemo 25,0 ml filtrata, dobljenega pod (5.2). V lij dodamo 100 ml diklorometana (3.1) in stresamo eno minuto. Počakamo, da se plasti ločijo, in odlijemo spodnjo (diklorometansko) plast v 500-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Ponovimo ekstrakcijo vodne faze z dvema nadaljnjima 40-mililitrskima porcijama diklorometana, ki ju priključimo prvemu ekstraktu v bučki z okroglim dnom. Uparimo ekstrakt diklorometana do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.2) pri znižanem tlaku in 40 °C. Ostanek raztopimo v 20 do 25 ml metanola (3.2), bučko zamašimo in ves ekstrakt hranimo za ionsko izmenjalno kromatografijo (5.4).

5.4 *Ionsko izmenjalna kromatografija*

5.4.1 Priprava kationsko izmenjalne kolone

V spodnji del steklene kolone (4.3) vstavimo zamašek iz steklene volne. Pripravimo suspenzijo s 5,0 g obdelane kationsko izmenjalne smole (3.6) in 50 ml klorovodikove kisline (3.5) in jo vlijemo v stekleno kolono ter počakamo, da se sesede. Presežek kisline odstranimo do višine tik nad površino smole, nato spiramo kolono z vodo do nevtralne reakcije eluata na lakmusov papir. 50 ml metanola (3.2) prenesemo v kolono in pustimo, da prodre na površino smole.

5.4.2 Kolonska kromatografija

S pipeto pazljivo prenesemo v (5.3) dobljeni ekstrakt na kolono. Bučko z okroglim dnom dvakrat speremo s 5 do 10 ml metanola (3.2), ki jih prenesemo na kolono. Ekstrakt spustimo do površine smole in speremo kolono s 50 ml metanola, pri čemer hitrost pretoka ne sme preseči 5 ml na minuto. Eluat zavržemo. Metil benzokvat eluiramo iz kolone s 150 ml raztopine metansulfonske kisline (3.4) v 250-mililitrsko erlenmajerico.

5.5 *Ločevanje tekočina-tekočina*

Eluat, dobljen v (5.4.2), prenesemo v 1-litrski lij ločnik. Erlenmajerico speremo s 5 do 10 ml metanola (3.2), ki ga združimo z vsebino v liju ločniku. Dodamo 300 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5) in 130 ml diklorometana (3.1). Stresamo 1 minuto in pustimo, da se fazi ločita. Odtočimo spodnjo (diklorometansko) plast v 500-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Ponovimo ekstrakcijo vodne faze z dvema nadaljnjima volumnoma po 70 ml diklorometana in oba ekstrakta združimo s prvim v bučki z okroglim dnom.

Ekstrakt diklorometana uparimo do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.2) pri znižanem tlaku in 40 °C. Ostanek v bučki raztopimo v približno 5 ml metanola (3.2) in prenesemo raztopino kvantitativno v 10-mililitrsko merilno bučko. Bučko z okroglim dnom speremo dvakrat s po 1 do 2 ml metanola, ki ju prenesemo v merilno bučko. Napolnimo do oznake z metanolom in premešamo. Alikvot filtriramo skozi membranski filter (4.6). Raztopino hranimo za HPLC-določitev (5.6).

5.6 *HPLC-določitev*

5.6.1 Parametri

Navedeni pogoji so podani kot smernice, lahko se uporabijo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate:

— Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)

— HPLC-mobilna faza (3.3): mešanica metanol-voda (3.3)

— Hitrost pretoka: 1 do 1,5 ml/min.

— Valovna dolžina detekcije: 265 nm

— Volumen vbrizga: od 20 do 50 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizganjem raztopine za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 4,0 µg/ml, dokler ne dobimo konstantnih višin ali površin vrhov in retenzijskih časov.

5.6.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.7.3) in izmerimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umeritev, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.6.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.5) in pri tem uporabljamo enake volumne kakor pri raztopini za umeritev ter določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov metil benzokvata.

6. **Izračun rezultatov**

Koncentracijo raztopine vzorca v µg/ml določimo iz srednjih vrednosti vrhov (površin) metil benzokvata iz umeritvene krivulje (5.6.2).

Vsebnost metil benzokvata w (mg/kg) v vzorcu je podana z naslednjo enačbo:

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

pri čemer je:

c = koncentracija metil benzokvata v raztopini vzorca, v µg/ml,

m = masa preskusnega vzorca, v gramih.

7. **Validacija rezultatov**

7.1 *Identiteta*

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, s katerim primerjamo spekter ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.7.3.), ki vsebuje 10,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom ustrezne množine vmesne standardne raztopine (3.7.2). Množina dodanega metil benzokvata mora biti podobna ovrednoteni množini metil benzokvata iz ekstrakta vzorca.

Povišan je lahko le vrh metil benzokvata, potem ko smo upoštevali tako dodano množino kakor tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici največje višine mora biti približno znotraj 10 % prvotne širine.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednje kriterije:

(a) valovna dolžina največje absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrhu kromatograma, mora biti enaka znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diod je to navadno v območju približno 2 nm;

(b) med 220 in 350 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha kromatograma, v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in kadar odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) med 220 in 350 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki ga dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in kadar odmik med spektri na nobeni od opazovanih točki ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eden od teh kriterijev ni izpolnjen, prisotnost analita ni bila potrjena.

7.2 *Ponovljivost*

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme biti večja od 10 % glede na višji rezultat za vsebnost metil benzokvata med 4 in 20 mg/kg.

7.3 *Izkoristek*

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 90 %.

8. **Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije**

V desetih laboratorijih so analizirali pet vzorcev. Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat.

Rezultati

	Slepi	Moka 1	Briketi 1	Moka 2	Briketi 2
Srednja vrednost (mg/kg)	n.o.	4,50	4,50	8,90	8,70
Sr (mg/kg)	–	0,30	0,20	0,60	0,50
CVr (%)	–	6,70	4,40	6,70	5,70
SR (mg/kg)	–	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	–	8,90	11,10	10,10	11,50
Izkoristek (%)	–	92,00	93,00	92,00	89,00

n.o. = ni zaznano
Sr = standardni odmik ponovljivosti
CVr = koeficient variacije ponovljivosti
SR = standardni odmik obnovljivosti
CV_R = koeficient variacije obnovljivosti