

F. STANOVENÍ DICLAZURILU

2,6-dichlor-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)yl)benzenacetoni-tril

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu diclazurilu v krmivech a premixech. Mez detekce je 0,1 mg/kg, mez kvantifikace 0,5 mg/kg.

2. Princip

Po přidání interního standardu se vzorek extrahuje okyseleným methanolem. U krmiv se alikvotní část extraktu přečistí na SPE patroně C₁₈. Diclazuril se z patrony eluuje směsí okyseleného methanolu a vody. Po odpaření se zbytek rozpustí v roztoku DMF/voda. U premixů se extrakt odpaří a zbytek se rozpustí v roztoku DMF/voda. Obsah diclazurilu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s ternárním gradientem s UV detekcí.

3. Chemikálie

3.1 Voda, pro HPLC.

3.2 Octan amonný.

3.3 Tetrabutylamonium hydrogensíran (TBHS).

3.4 Acetonitril, pro HPLC.

3.5 Methanol, pro HPLC.

3.6 N,N-dimethylformamid (DMF).

3.7 Kyselina chlorovodíková, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8 Standardní látka: diclazuril II-24: 2,6-dichlor-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)yl)benzenacetoni-tril, deklarované čistoty, E 771.

3.8.1 Základní standardní roztok diclazurilu, 500 μ g/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg diclazurilu (3.8) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (3.6), doplní se DMF (3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.8.2 Pracovní standardní roztok diclazurilu, 50 μ g/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml základního standardního roztoku (3.8.1), doplní se DMF (3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9 Interní standardní substance: 2,6-dichloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)-yl)- α -methylbenzen-acetonitril.

3.9.1 Interní základní standardní roztok, 500 μ g/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg interní standardní substance (3.9) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (3.6), doplní se DMF (3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.2 Interní standardní roztok, 50 μ g/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml interního základního standardního roztoku (3.9.1), doplní se DMF (3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.3 Interní standardní roztok pro premixy, p/1 000 mg/ml

(p = deklarovaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg)

Do 100 ml odměrné baňky se naváží p/10 mg interní standardní substance s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (3.6) v ultrazvukové lázni (4.6), doplní DMF po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.10 Kalibrační roztok, 2 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 2,00 ml standardního roztoku diclazurilu (3.8.2) a 2,00 ml interního standardního roztoku (3.9.2). Přidá se 16 ml DMF (3.6), doplní se vodou po značku a promíchá. Tento roztok se připravuje čerstvý před použitím.

3.11 SPE patrona C₁₈, např. Bond Elut, velikost: 1 ml, sorpční hmotnost: 100 mg.

3.12 Extrakční směs: okyselený methanol.

Do 1 000 ml methanolu (3.5) se napipetuje 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.7) a promíchá.

3.13 Mobilní fáze pro HPLC.

3.13.1 Složka (eluent) A: roztok octanu amonného a tetrabutylamonium hydrogensíranu.

5 g octanu amonného (3.2) a 3,4 g TBHS (3.3) se rozpustí v 1 000 ml vody a promíchá se.

3.13.2 Složka (eluent) B: acetonitril (3.4).

3.13.3 Složka (eluent) C: methanol (3.5).

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mechanické míchací zařízení.

4.2 Zařízení pro HPLC s ternárním gradientem.

4.2.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, Hypersil ODS, náplň 3 µm, 100 mm × 4,6 mm nebo obdobná.

4.2.2 UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor diodového pole.

4.3 Rotační odparka.

4.4 Membránový filtr, 0,45 µm.

4.5 Vakuové zařízení.

4.6 Ultrazvuková lázeň.

5. Postup

5.1 Obecné pokyny

5.1.1 Slepý vzorek krmiva

Za účelem kontroly toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani diclazuril, ani jiné rušivé látky, se provede slepá zkouška. Slepý vzorek krmiva má podobné složení jako zkoušený vzorek a není zjištěn diclazuril ani jiné rušivé látky.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Zkouška na výtěžnost se provede na slepém vzorku krmiva, ke kterému bylo přidáno takové množství diclazurilu, které odpovídá množství diclazurilu ve zkoušeném vzorku. Pro obohacení na obsah 1 mg/kg se k 50 g slepého vzorku krmiva přidá 0,1 ml základního standardního roztoku (3.8.1). Důkladně se promíchá, nechá se 10 minut stát a před zahájením extrakce (5.2) se znovu několikrát promíchá.

Není-li k dispozici slepý vzorek krmiva podobného složení jako zkoušený vzorek (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídatku. V tom případě se ke zkoušenému vzorku přidá přibližně stejné množství diclazurilu, jaké je ve vzorku již obsaženo. Obohacený vzorek se potom zkouší společně se vzorkem neobohaceným a výtěžnost se vypočte odečtením.

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva

Do 500 ml kónické baňky se naváží 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přidá se 1,00 ml interního standardního roztoku (3.9.2) a 200 ml extrakční směsi (3.12) a baňka se uzavře. Směs se přes noc třepe na míchacím zařízení (4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 20 ml supernatantu se převede do vhodné skleněné nádoby a zředí se 20 ml vody. Tento roztok se nanese na extrakční patronu (3.11) a prosaje se pomocí vakua (4.5). Patrona se promyje 25 ml směsí složené z extrakční směsi (3.12) a vody, 65 + 35 (V + V). Spojené frakce se odstraní, účinná látka a interní standard se eluují 25 ml směsí složené z extrakční směsi (3.12) a vody, 80 + 20 (V + V). Tato frakce se v rotační odparce (4.3) odpaří při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 1,0 ml DMF (3.6), přidá se 1,5 ml vody (3.1) a promíchá. Roztok se přefiltruje přes membránový filtr (4.4). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.2.2 Premixy

Do 500 ml kónické baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 1,00 ml interního standardního roztoku (3.9.3) a 200 ml extrakční směsi (3.12) a baňka se uzavře. Směs se přes noc třepe na třepačce (4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 10 000/p ml (p = deklarovaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg) supernatantu se převede do baňky s kulatým dnem vhodné velikosti. V rotační odparce (4.3) se odpaří za sníženého tlaku při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml DMF (3.6), přidá se 15,0 ml vody (3.1) a promíchá. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry

Níže uvedené podmínky jsou doporučené, lze použít jiné podmínky, pokud poskytnou rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, náplň 3 µm nebo obdobná

Mobilní fáze:	Složka A (3.13.1):	vodný roztok octanu amonného a tetrabutylamonium hydrogensíranu
	Složka B (3.13.2):	acetonitril
	Složka C (3.13.3):	methanol

Druh eluce:

- lineární gradientová eluce
- výchozí podmínky: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
- po 10 minutách gradientová eluce po dobu 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)

10 minut proplachovat složkou B

Průtok: 1,5–2 ml/min

Objem nástřiku: 20 µl

Vlnová délka detektoru: 280 nm

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.10), který obsahuje 2 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační roztok

Několikrát se nastříkuje 20 µl kalibračního roztoku (3.10) a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píku diclazurilu a interního standardu.

5.3.3 Roztok vzorku

Několikrát se nastříkuje 20 µl roztoku vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píku diclazurilu a interního standardu.

6. Výpočet výsledků

6.1 Krmiva

Obsah diclazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} (\text{mg/kg})$$

kde:

- $h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v roztoku vzorku (5.2.1)
- $h_{i,s}$ = výška (plocha) píku interního standardu v roztoku vzorku (5.2.1)
- $h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v kalibračním roztoku (3.10)
- $h_{i,c}$ = výška (plocha) píku interního standardu v kalibračním roztoku (3.10)
- $c_{d,c}$ = koncentrace diclazurilu v kalibračním roztoku v $\mu\text{g/ml}$ (3.10)
- m = hmotnost navážky vzorku v g
- V = objem extrakční směsi podle 5.2.1 (tj. 2,5 ml).

6.2 Premixy

Obsah diclazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} (\text{mg/kg})$$

kde:

- $h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v kalibračním roztoku (3.10)
- $h_{i,c}$ = výška (plocha) píku interního standardu v kalibračním roztoku (3.10)
- $h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diclazurilu v roztoku vzorku (5.2.2)
- $h_{i,s}$ = výška (plocha) píku interního standardu v roztoku vzorku (5.2.2)
- $c_{d,c}$ = koncentrace diclazurilu v kalibračním roztoku v $\mu\text{g/ml}$ (3.10)
- m = hmotnost navážky vzorku v g
- V = objem extrakční směsi podle 5.2.2 (tj. 25 ml)
- p = deklarovaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg.

7. Ověření výsledků

7.1 Identita

Identitu analytů lze potvrdit opakovaným stanovením s přidavkem (co-chromatography) nebo využitím detektoru diodového pole, přičemž se srovnávají spektra extraktu vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) a kalibračního roztoku (3.10).

7.1.1 Opakované stanovení s přidavkem (co-chromatography)

K extraktu vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.10). Přidané množství diclazurilu musí odpovídat obsahu diclazurilu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku diclazurilu a píku interního standardu, a to úměrně přidanému množství a ředění. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchylovat od šířky původního píku diclazurilu nebo píku interního standardu v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o $\pm 10\%$.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky jsou posuzovány podle následujících kritérií:

- a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor diodového pole se udává obvykle ± 2 nm;
- b) při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí záznam spektra zkoušeného vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže odchylka mezi dvěma spektry nikde nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu;

- c) při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % 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 některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit:

- 30 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu diclazurilu mezi 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg u obsahu diclazurilu mezi 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,
- 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu diclazurilu nad 5 mg/kg.

7.3 Výtěžnost

Pro obohacený (slepý) vzorek musí být výtěžnost nejméně 80 %.

8. Výsledky kruhových testů

Při mezilaboratorních zkouškách bylo zkoušeno 5 vzorků 11 laboratořemi. Tyto vzorky sestávaly ze dvou premixů, z nichž jeden byl smíšen s organickou (O 100) a druhý s anorganickou maticí (A 100). Teoretický obsah diclazurilu je 100 mg/kg. Tři krmné směsi pro drůbež pocházely od 3 různých výrobců (NL) (L1/Z1/K1). Teoretický obsah diclazurilu je 1 mg/kg. Laboratoře byly pověřeny, aby každý ze vzorků podrobily jedné nebo dvěma zkouškám. (Přesnější údaje o těchto kruhových testech viz *Journal of AOAC International, Volume 77, N°6, 1994, s. 1 359–1 361*). Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce.

	Vzorek 1 A 100	Vzorek 2 O 100	Vzorek 3 L1	Vzorek 4 Z1	Vzorek 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Průměr	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
Deklarovaný obsah (mg/kg)	100	100	1	1	1

- L = počet laboratoří
n = počet jednotlivých hodnot
S_r = standardní odchylka opakovatelnosti
CV_r = variační koeficient opakovatelnosti
S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti
CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti.

9. Poznámky

Musí být předem prokázáno, že odezva diclazurilu je měřena v lineární oblasti koncentrace.

G. STANOVENÍ OBSAHU LASALOCIDU

Sodná sůl polyetherové karboxylové kyseliny produkované Streptomyces lasaliensis