

- 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

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu lasalocidu v krmivech a premixech. Mez detekce je 5 mg/kg, mez kvantifikace 10 mg/kg.

2. Princip

Lasalocid se extrahuje ze vzorku okyseleným methanolem a stanoví se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s použitím spektrofotometru.

3. Chemikálie

3.1 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4).

3.2 Kyselina fosforečná, w (w/w) = 85 %.

3.3 Roztok kyseliny fosforečné, c = 20 %.

23,5 ml kyseliny fosforečné (3.2) se doplní vodou na 100 ml.

3.4 6-methyl-2-heptylamin (1,5-dimethylhexylamin), w (w/w) = 99 %.

3.5 Methanol, pro HPLC.

3.6 Kyselina chlorovodíková, hustota = 1,19 g/ml.

3.7 Fosfátový tlumivý roztok, c = 0,01 mol/l.

V 500 ml vody (3.11) se rozpustí 1,36 g KH_2PO_4 (3.1), přidá se 3,5 ml kyseliny fosforečné (3.2) a 10,0 ml 6-methyl-2-heptylaminu (3.4). Hodnota pH se upraví roztokem kyseliny fosforečné (3.3) na 4,0 a doplní se vodou (3.11) na 1 000 ml.

3.8 Okyselený methanol.

Do 1 000 ml odměrné baňky se odměří 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6), doplní se methanolem (3.5) po značku a promíchá. Tento roztok se připravuje čerstvý před použitím.

3.9 HPLC mobilní fáze, roztok fosfátového tlumivého roztoku a methanolu 5 + 95 (V + V).

Smíchá se 5 ml fosfátového tlumivého roztoku (3.7) a 95 ml methanolu (3.5).

3.10 Standardní látka lasalocid, sodná sůl s deklarovanou čistotou, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sodná sůl polyetherové karboxylové kyseliny produkované *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1 Základní standardní roztok lasalocidu, 500 $\mu\text{g/ml}$

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 50 mg lasalocidu (3.10) s přesností na 0,1 mg a rozpustí se v okyseleném methanolu (3.8), doplní se jím po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat čerstvý před použitím.

3.10.2 Pracovní standardní roztok lasalocidu, 50 $\mu\text{g/ml}$

10,0 ml základního standardního roztoku (3.10.1) se odpipetuje do 100 ml odměrné baňky, doplní se po značku okyseleným methanolem (3.8) a promíchá. Tento roztok se musí připravovat čerstvý před použitím.

3.10.3 Kalibrační roztoky

Do řady 50 ml odměrných baněk se odpipetuje 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku (3.10.2). Doplní se po značku okyseleným methanolem (3.8) a promíchá. Tyto roztoky odpovídají 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 µg lasalocidu na ml. Tyto roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.

3.11 Voda, pro HPLC.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Ultrazvuková lázeň (nebo vodní třepací lázeň) s kontrolou teploty.

4.2 Membránové filtry, 0,45 µm.

4.3 Zařízení HPLC s dávkovacím systémem na 20 µl.

4.3.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii 125 mm × 4 mm, reverzní fáze C₁₈, náplň 5 µm nebo obdobná.

4.3.2 Spektrofluorimetr s nastavitelnou excitační i emisní vlnovou délkou.

5. Postup

5.1 *Obecné pokyny*

5.1.1 Slepý vzorek krmiva

Pro provedení zkoušky na výtěžnost (5.1.2) se provede zkouška slepého vzorku krmiva pro kontrolu, že není přítomen ani lasalocid ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva má podobné složení jako zkoušený vzorek a není zjištěn lasalocid 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 lasalocidu, které odpovídá množství lasalocidu ve zkoušeném vzorku. Pro obohacení na obsah 100 mg/kg se přidá 10,0 ml základního standardního roztoku (3.10.1) do 250 ml kónické baňky a roztok se odpaří na objem asi 0,5 ml. Potom se přidá 50 g slepého vzorku krmiva. 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 lasalocidu, 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 250 ml kónické baňky se zátkou se naváží 5–10 g vzorku s přesností na 0,01 g. Pipetou se přidá 100,0 ml okyseleného methanolu (3.8). Baňka se volně uzavře zátkou a promíchá kroužením. Potom se vloží na 20 minut do ultrazvukové lázně (4.1) při teplotě asi 40 °C. Pak se baňka vyjme a ochladí na laboratorní teplotu. Nechá se stát asi hodinu, aby se usadily suspedované částice, a potom se alikvotní část přefiltruje přes membránový filtr 0,45 µm (4.2) do vhodné nádoby. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.2.2 Premixy

Do 250 ml odměrné baňky se naváží asi 2 g nemletého vzorku premixu s přesností na 0,001 g. Přidá se 100,0 ml okyseleného methanolu (3.8) a promíchá kroužením. Potom se vloží na 20 minut do ultrazvukové lázně (4.1) při teplotě asi 40 °C. Pak se baňka vyjme a ochladí na laboratorní teplotu. Doplní se po značku okyseleným methanolem (3.8) a důkladně promíchá. Nechá se stát asi hodinu, aby se usadily suspedované částice, a potom se alikvotní část přefiltruje přes membránový filtr 0,45 µm (4.2). Vhodný objem čirého filtrátu se naředí okyseleným methanolem (3.8) na konečnou koncentraci asi 4 µg/ml lasalocidu. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry

Následující podmínky jsou doporučeny; mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky:

Kolona pro kapalinovou 125 mm × 4 mm, reverzní fáze C₁₈, náplň 5 μm nebo obdobná chromatografie (4.3.1):

Mobilní fáze (3.9): směs fosfátového tlumivého roztoku (3.7) a methanolu (3.5), 5 + 95 (V + V)

Průtok: 1,2 ml/min

Detekční vlnová délka:

excitace: 310 nm

emise: 419 nm

Objem nástřiku: 20 μl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.10.3), který obsahuje 4,0 μg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (nebo ploch) píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační křivka

Každý kalibrační roztok (3.10.3) se nastříkuje několikrát a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením průměrných hodnot výšek nebo ploch píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v μg/ml.

5.3.3 Roztok vzorku

Extrakt ze vzorku 5.2.1 nebo 5.2.2 se nastříkuje několikrát za použití stejného objemu jako v případě kalibračního roztoku a zjišťuje se průměrná hodnota výšek (ploch) píků lasalocidu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píku v roztoku vzorku (5.3.3) se porovnáním s kalibrační křivkou stanoví koncentrace lasalocidu v μg/ml.

6.1 Krmiva

Obsah lasalocidu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ (mg/kg)}$$

kde:

c = koncentrace lasalocidu v roztoku vzorku (5.2.1) v μg/ml

V₁ = objem extraktu vzorku podle 5.2.1 v ml (tj. 100 ml)

m = hmotnost navážky vzorku v g.

6.2 Premixy

Obsah lasalocidu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ (mg/kg)}$$

kde:

c = koncentrace lasalocidu v roztoku vzorku (5.2.2) v μg/ml

V₂ = objem extraktu vzorku podle 5.2.2 v ml (tj. 250 ml)

f = faktor ředění podle 5.2.2

m = hmotnost navážky vzorku v g.

7. Ověření výsledků

7.1 Identita

Metody založené na spektrofotometrické detekci jsou méně náchylné na interference než metody s UV detekcí. Identita analytu může být potvrzena opakovaným stanovením s přidavkem (co-chromatography).

7.1.1 Opakované stanovení s přidávkem (co-chromatography)

K extraktu vzorku (5.2.1 nebo 5.2.2) se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.10.3). Přidané množství lasalocidu musí odpovídat obsahu lasalocidu v extraktu vzorku. Přídavek se projeví pouze zvýšením píku lasalocidu, a to úměrně k přidanému množství lasalocidu a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchylovat od šířky původního píku v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o ± 10 %.

7.2 Opakovatelnost

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

- 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku pro obsah lasalocidu v rozmezí od 30 mg/kg do 100 mg/kg,
- 15 mg/kg pro obsah lasalocidu v rozmezí od 100 mg/kg do 200 mg/kg,
- 7,5 % relat. z hodnoty vyššího výsledku pro obsah lasalocidu nad 200 mg/kg.

7.3 Výtěžnost

Pro obohacený (slepý) vzorek krmiva je výtěžnost nejméně 80 %. Pro obohacené vzorky premixů je výtěžnost nejméně 90 %.

8. Výsledky kruhových testů

Kruhové testy (*) byly provedeny se 2 vzorky premixů (vzorky 1 a 2) a 5 vzorky krmiva (vzorky 3–7) ve 12 laboratořích. U každého vzorku byly provedeny dvě zkoušky. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Vzorek 1 Premix pro kuřata	Vzorek 2 Premix pro krůty	Vzorek 3 Krmná směs pro krůty pele- tovaná	Vzorek 4 Krmná směs pro kuřata sypká	Vzorek 5 Krmná směs pro krůty	Vzorek 6 Krmná směs pro drůbež A	Vzorek 7 Krmná směs pro drůbež B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
průměr (mg/ kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Deklarovaný obsah (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Obsah deklarovaný výrobcem.

(**) Krmivo připravené v laboratoři.

- L = počet laboratoří
n = počet jednotlivých hodnot
 s_r = standardní odchylka opakovatelnosti
 s_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti
 CV_r = variační koeficient opakovatelnosti v %
 CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti v %.