

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku týměž laborantem nesmí překročit:

- 5 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku do 50 mg/kg,
- 10 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku od 50 do 100 mg/kg,
- 10 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku od 100 do 200 mg/kg,
- 5 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku nad 200 mg/kg.

8. Poznámka

Přítomnost velkého množství fosfátů může ovlivňovat stanovení železa, manganu a zinku. Proto musí být přidáván roztok chloridu lanthanitého (3.11). Pokud je váhový poměr (Ca + Mg)/P ve vzorku > 2, nemusí se do roztoku pro zkoušku ani do kalibračních roztoků přidávat roztok chloridu lanthanitého (3.11).

D. STANOVENÍ OBSAHU HALOFUGINONU

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu halofuginonu v krmivech. Mez kvantifikace je 1 mg/kg.

2. Princip

Obsah halofuginonu se stanoví jako volná báze po extrakci horkou vodou do ethylacetátu a následně se rozdělí jako hydrochlorid do vodného kyselého roztoku. Extrakt se přečistí na ionexové chromatografické koloně. Obsah halofuginonu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. Chemikálie

- 3.1 Acetonitril, pro HPLC.
- 3.2 Amberlit XAD-2 ionexová pryskyřice.
- 3.3 Octan amonný.
- 3.4 Ethylacetát.
- 3.5 Kyselina octová, ledová.
- 3.6 Halofuginon, standardní látka (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid, E 764).
- 3.6.1 Halofuginon, standardní zásobní roztok, 100 µg/ml

Do 500 ml odměrné baňky se naváží 50 mg halofuginonu (3.6) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v tlumivém roztoku octanu amonného (3.18), doplní se značku tlumivým roztokem a promíchá. Tento roztok je stálý tři týdny při teplotě 5 °C, je-li skladován ve tmě.

3.6.2 Kalibrační roztoky

Do řady 100 ml odměrných baněk se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 ml standardního zásobního roztoku (3.6.1). Doplní se po značku mobilní fázi (3.21) a promíchá. Roztoky mají koncentrace halofuginonu 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 µg/ml. Tyto roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.

- 3.7 Kyselina chlorovodíková (ρ_{20} přibližně 1,16 g/ml).
- 3.8 Methanol.
- 3.9 Dusičnan stříbrný.
- 3.10 Askorbát sodný.
- 3.11 Uhličitan sodný.
- 3.12 Chlorid sodný.
- 3.13 EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové).
- 3.14 Voda, pro HPLC.
- 3.15 Uhličitan sodný, roztok, $c = 10$ g/100 ml.
- 3.16 Uhličitan sodný, roztok, saturovaný chloridem sodným, $c = 5$ g/100 ml.
- 50 g uhličitanu sodného (3.11) se rozpustí ve vodě, doplní se na 1 000 ml a přidává se chlorid sodný (3.12), až k nasycení roztoku.
- 3.17 Kyselina chlorovodíková, přibližně 0,1 mol/l.
- 10 ml HCl (3.7) se zředí vodou na 1 000 ml.
- 3.18 Tlumivý roztok octanu amonného, přibližně 0,25 mol/l.
- 19,3 g octanu amonného (3.3) a 30 ml kyseliny octové (3.5) se rozpustí ve vodě (3.14) a zředí se na 1 000 ml.
- 3.19 Ionexová pryskyřice Amberlit XAD-2 – příprava.
- Přiměřené množství amberlitu (3.2) se promývá ve vodě, až se odstraní všechny chloridové ionty, což se prokáže zkouškou pomocí dusičnanu stříbrného (3.20) na odstraňované vodní fázi. Pak se pryskyřice promyje 50 ml methanolu (3.8), který se odstraní, a pryskyřice se uloží pod čerstvý methanol.
- 3.20 Dusičnan stříbrný, roztok přibližně 0,1 mol/l.
- 0,17 g dusičnanu stříbrného (3.9) se rozpustí v 10 ml vody.
- 3.21 Mobilní fáze HPLC.
- Smíchá se 500 ml acetonitrilu (3.1), 300 ml tlumivého roztoku octanu amonného (3.18) a 1 200 ml vody (3.14). pH se upraví na 4,3 za použití kyseliny octové (3.5). Přefiltruje se filtrem 0,22 μm (4.8) a roztok se odplyní (např. tím, že se vystaví ultrazvuku po dobu 10 minut). Tento roztok je stálý jeden měsíc, je-li skladován ve tmě a v uzavřené nádobě.
4. **Přístroje a pomůcky**
- 4.1 Ultrazvuková lázeň.
- 4.2 Rotační odparka.
- 4.3 Odstředivka.
- 4.4 Zařízení HPLC s ultrafialovým detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou nebo s detektorem diodového pole.
- 4.4.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 300 mm \times 4 mm, C_{18} , náplň 10 μm , nebo obdobná kolona.
- 4.5 Skleněné kolony (300 mm \times 10 mm) opatřené filtrem z křemičitého skla a uzavíracím kohoutem.
- 4.6 Filtry ze skleněných vláken, průměr 150 mm.

4.7 Membránové filtry, 0,45 μm .

4.8 Membránové filtry, 0,22 μm .

5. Postup

Poznámka: Halofuginon jako volná báze je nestálý v alkalických roztocích a v roztocích ethylacetátu. Nesmí zůstat v roztoku ethylacetátu déle než 30 minut.

5.1 Obecné pokyny

5.1.1 Slepý vzorek krmiva se předem podrobí zkoušce pro kontrolu, zda neobsahuje halofuginon nebo jiné rušivé látky.

5.1.2 Proveďte se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, které bylo obohaceno přidáním takového množství halofuginonu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na úroveň 3 mg/kg se přidá 300 μl standardního zásobního roztoku (3.6.1) k 10 g slepého vzorku krmiva, promíchá se a vyčká 10 minut, potom se pokračuje v extrakčním postupu (5.2).

Poznámka: Pro účely této metody je slepý vzorek krmiva podobného druhu jako vzorek a při zkoušce není zjištěn halofuginon.

5.2 Extrakce

Do odstředivkové zkumavky o obsahu 200 ml se naváží 10 g upraveného vzorku s přesností na 0,1 g, přidá se 0,5 g askorbátu sodného (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) a 20 ml vody a promíchá se. Zkumavka se umístí na 5 minut do vodní lázně (80 °C). Po vychladnutí na laboratorní teplotu se přidá 20 ml roztoku uhličitanu sodného (3.15) a promíchá se. Ihned se přidá 100 ml ethylacetátu (3.4) a ručně se 15 sekund intenzivně třepe. Pak se zkumavka s uvolněnou zátkou umístí na tři minuty do ultrazvukové lázně (4.1). Odstředí se dvě minuty a ethylacetátová fáze se odlije přes filtr ze skleněných vláken (4.6) do 500 ml separační nálevky. Extrakce vzorku se opakuje s dalšími 100 ml ethylacetátu. Kombinované extrakty se promývají jednu minutu 50 ml roztoku uhličitanu sodného saturovaného chloridem sodným (3.16) a poté se vodná vrstva odstraní.

Organická vrstva se extrahuje po dobu jedné minuty 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.17). Spodní kyselinová vrstva se vypustí do 250 ml separační nálevky. Organická vrstva se znovu extrahuje 1,5 minuty s dalšími 50 ml kyseliny chlorovodíkové a kyselinová vrstva se spojí s prvním extraktem. Spojené kyselinové extrakty se třepou přibližně 10 sekund s 10 ml ethylacetátu (3.4).

Vodná vrstva se kvantitativně převede do 250 ml baňky s kulatým dnem a organická fáze se odstraní. Pomocí rotační odparky (4.2) se z kyselého roztoku odpaří všechen zbývající ethylacetát. Teplota vodní lázně nesmí přesáhnout 40 °C. Ve vakuu přibližně 25 mbar se všechen zbývající ethylacetát odstraní během 5 minut při teplotě 38 °C.

5.3 Přečištění

5.3.1 Příprava amberlitové kolony

Pro každý extrakt vzorku se připraví kolona s XAD-2. Do skleněné kolony (4.5) se přenese 10 g připraveného amberlitu (3.19) spolu s methanolem (3.8). Na horní konec pryskyřicové kolony se vloží malá zátká ze skelné vaty. Methanol z kolony se odstraní a kolona se promyje 100 ml vody. Přívod vody se zastaví, jakmile tekutina dosáhne horního konce pryskyřicové kolony. Před použitím se kolona nechá 10 minut ekvilibrovat. Kolona nesmí nikdy vyschnout.

5.3.2 Přečištění vzorku

Extrakt (5.2) se kvantitativně převede na horní část připravené amberlitové kolony (5.3.1) a eluuje se, přičemž se eluát odstraňuje. Rychlost promývání nesmí přesáhnout 20 ml/min. Baňka s kulatým dnem se vypláchne 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.17) a tato tekutina se použije k promytí pryskyřicové kolony. Zbytek kyselého roztoku se z kolony odstraní proudem vzduchu. Promývací roztok se také odstraní. Na kolonu se přidá 100 ml methanolu (3.8) a vypustí se asi 5–10 ml eluátu do 250 ml baňky s kulatým dnem. Zbývající methanol se nechá 10 minut ustát na koloně a potom se pokračuje v promývání rychlostí, která nepřesáhne 20 ml/min. Eluát se shromažďuje v téže baňce s kulatým dnem. Methanol se odpaří na rotační odparce (4.2), teplota vodní lázně nesmí přesáhnout 40 °C. Odparek se pomocí mobilní fáze (3.21) kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky. Doplní se mobilní fází po značku a promíchá. Alikvotní část se filtruje membránovým filtrem (4.7). Tento roztok se uschová pro stanovení HPLC (5.4).

5.4 Stanovení HPLC

5.4.1 Parametry

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují srovnatelné výsledky:

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.4.1).

HPLC mobilní fáze (3.21).

Průtok: 1,5–2 ml/min.

Detekční vlnová délka: 243 nm.

Objem nástřiku: 40–100 µl.

Stálost chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.6.2), který obsahuje 3,0 µg/ml halofuginonu. Opakuje se několikrát, až se dosáhne konstantní výšky (plochy) píků a konstantních retenčních časů.

5.4.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik každého kalibračního roztoku (3.6.2) 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.

5.4.3 Roztok vzorku

Provede se několikrát nástřik roztoku vzorku (5.3.2), přičemž se použije stejný objem jako pro kalibrační roztoky a zjistí se průměrná hodnota výšky (plochy) halofuginonových píků.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Koncentrace halofuginonu v roztoku vzorku v µg/ml se stanoví podle průměrné hodnoty výšky (plochy) halofuginonových píků v roztoku vzorku porovnáním s kalibrační křivkou (5.4.2).

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

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kde:

c : koncentrace halofuginonu v roztoku vzorku v µg/ml

m : hmotnost navážky vzorku v gramech.

7. Ověření výsledků

7.1 Identita

Identita analytu může být potvrzena opakovaným stanovením s přidavkem (co-chromatography) nebo využitím detektoru diodového pole, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (3.6.2) obsahujícího 6,0 µg/ml halofuginonu.

7.1.1 Opakované stanovení s přidavkem (co-chromatography)

K extraktu vzorku se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.6.2). Množství přidaného halofuginonu musí odpovídat odhadovanému obsahu halofuginonu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku halofuginonu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchýlovat od šířky původního píku nejvýše o ±10 %.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky jsou posuzovány podle následujících kritérií:

- 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 diodového pole se udává ± 2 nm;
- při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí záznam spektra ve zkoušeném 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;
- při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních 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 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 na stejném vzorku nesmí překročit 0,5 mg/kg při obsahu halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3 Výtěžnost

Výtěžnost pro obohacený slepý vzorek krmiva musí být nejméně 80 %.

8. Výsledky kruhových testů

Při kruhových testech ⁽¹⁾ byly osmi laboratořemi zkoušeny tři vzorky.

Výsledky

	Vzorek A (slepý) při převzetí	Vzorek B (mouka)		Vzorek C (pelety)	
		při převzetí	po dvou měsících	při převzetí	po dvou měsících
průměr (mg/kg)	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R (mg/kg)	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R (%)	—	16	18	14	17
Rec. (%)		86	74	88	75

ND = nezjištěno

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti (%)

Rec. = výtěžnost (%).

E. STANOVENÍ OBSAHU ROBENIDINU

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

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu robenidinu v krmivech. Mez kvantifikace je 5 mg/kg.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, s. 1 252–1 256.