

PŘÍLOHA VIII

METODY ZKOUŠENÍ PRO KONTROLU NEPŘÍPUSTNÉ PŘÍTOMNOSTI JIŽ NEPOVOLENÝCH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK V KRMIVECH

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ:

Pro zjištění nepřijatelné přítomnosti již nepovolených doplňkových látek v krmivech lze použít citlivější metody zkoušení, než jsou metody zkoušení uvedené v této příloze.

Metody zkoušení uvedené v této příloze se použijí pro účely potvrzování.

A. STANOVENÍ OBSAHU METHYLBENZOCHÁTU

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

1. **Účel a rozsah**

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

2. **Princip**

Methylbenzochát se extrahuje ze vzorku pomocí methanového roztoku kyseliny methansulfonové. Extrakt se přečistí dichlormethanem, ionexovou chromatografií, a následně pak znovu dichlormethanem. Obsah methylbenzochátu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. **Chemikálie**

3.1 Dichlormethan.

3.2 Methanol, pro HPLC.

3.3 Mobilní fáze HPLC.

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

Přefiltruje se filtrem 0,22 µm (4.5) a roztok se odplyní (např. vystaví se ultrazvuku po dobu 10 minut).

3.4 Roztok kyseliny methansulfonové, c = 2 %.

20 ml kyseliny methansulfonové se zředí v 1 000 ml methanolu (3.2).

3.5 Roztok kyseliny chlorovodíkové, c = 10 %.

100 ml kyseliny chlorovodíkové (ρ_{20} 1,18 g/ml) se zředí v 1 000 ml vody.

3.6 Ionex Amberlit CG – 120 (Na), 100–200 mesh.

100 g ionexu se rozmíchá v 500 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.5) a za stálého míchání se zahřeje na topné desce k varu. Po ochlazení se kyselina dekantuje. Filtruje se přes papírový filtr za vakua. Ionex se propláchne dvakrát 500 ml vody a potom 250 ml methanolu (3.2). Potom se ionex propláchne dalšími 250 ml methanolu a vysuší se prosáváním vzduchu přes filtrační koláč. Vysušený ionex se uchovává v uzavřené láhvi.

- 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 methylbenzochátu, 500 µg/ml
- Navází se 50 mg standardní látky (3.7) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se ve 100 ml odměrné baňce v roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), doplní se jí po značku a promíchá.
- 3.7.2 Pracovní standardní roztok methylbenzochátu, 50 µg/ml
- Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml základního standardního roztoku methylbenzochátu (3.7.1), doplní se methanolem (3.2) po značku a promíchá.
- 3.7.3 Kalibrační roztoky
- Do sady 25 ml odměrných baněk se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml pracovního standardního roztoku methylbenzochátu (3.7.2). Doplní se po značku mobilní fází (3.3) a promíchá. Tyto roztoky mají koncentrace 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 µg/ml methylbenzochátu. Tyto roztoky se připravují čerstvé před použitím.
- 4. Přístroje a pomůcky**
- 4.1 Laboratorní míchací zařízení.
- 4.2 Rotační odparka.
- 4.3 Skleněná kolona (250 mm × 15 mm) vybavená uzavíracím kohoutkem a nádržkou s kapacitou asi 200 ml.
- 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 × 4 mm, C₁₈, náplň 10 µm nebo obdobná.
- 4.5 Membránové filtry, 0,22 µm.
- 4.6 Membránové filtry, 0,45 µm.
- 5. Postup**
- 5.1 *Obecné pokyny*
- 5.1.1 Provede se zkouška slepého vzorku krmiva, aby se prokázalo, že v něm není přítomen ani methylbenzochát, ani jiné rušivé látky.
- 5.1.2 Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, ke kterému bylo přidáno takové množství methylbenzochátu, které odpovídá množství ve vzorku. Pro obohacení na úroveň 15 mg/kg se přidá ke 20 g slepého vzorku krmiva 600 µl základního standardního roztoku (3.7.1), promíchá se a po 10 minutách se začne s extrakcí (5.2).
- Poznámka:* slepý vzorek krmiva pro účel této metody je podobného typu jako vzorek a při jeho zkoušce nesmí být zjištěn methylbenzochát.
- 5.2 *Extrakce*
- Do 250 ml kónické baňky se navází s přesností na 0,01 g asi 20 g upraveného vzorku. Přidá se 100 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4) a mechanicky se třepe (4.1) po dobu 30 minut. Roztok se přefiltruje přes papírový filtr a filtrát se použije na extrakci kapalina-kapalina (5.3).
- 5.3 *Extrakce kapalina-kapalina*
- Do 500 ml dělicí nálevky obsahující 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.5) se přidá 25,0 ml filtrátu, který byl získán postupem uvedeným v bodě 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 ty 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 s iontovou výměnou

5.4.1 Příprava ionexové kolony

Do dolního konce skleněné kolony (4.3) se vloží tampon ze skelné vaty. Připraví se suspenze z 5,0 g upraveného ionexu (3.6) a z 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5). Tato směs se nalije do skleněné kolony a nechá se usadit. Přebytečná kyselina se odpustí až těsně nad hladinu ionexu 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 5–10 ml methanolu (3.2) a výplachy se také převedou na kolonu. Kolona se promyje 50 ml methanolu tak, aby průtok nepřesahoval 5 ml za minutu. Proteklá kapalina se odstraní. Methylbenzochát se eluuje z kolony 150 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4) a eluát se jímá do 250 ml kónické baňky.

5.5 Extrakce kapalina-kapalina

Získaný eluát (5.4.2) se převede do 1 000 ml dělicí nálevky. Kónická baňka se propláchne 5–10 ml methanolu (3.2) a výplach se přidá do dělicí nálevky. Dále se do dělicí 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 separovat. Spodní vrstva (dichlormethanu) 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 1–2 ml methanolu a opět se převede do odměrné baňky. Baňka se doplní po značku methanolem a promíchá. Alikvotní část se přefiltruje přes membránový filtr (4.6). Tento roztok se použije pro stanovení HPLC (5.6).

5.6 Stanovení HPLC

5.6.1 Parametry

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

- kolona pro kapalinovou chromatografii (4.4.1),
- mobilní fáze HPLC: směs methanolu a vody (3.3),
- průtok: 1–1,5 ml/min,
- vlnová délka detektoru: 265 nm,
- objem nástřiku: 20–50 µl.

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

5.6.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik každého kalibračního roztoku (3.7.3) a změří 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.

5.6.3 Roztok vzorku

Opakovaně se nástřikuje extrakt vzorku (5.5) s použitím stejného objemu, jaký byl použit pro kalibrační roztoky, a určí se průměrná hodnota výšky (plochy) píků methylbenzochátu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků methylbenzochátu v roztoku vzorku se stanoví koncentrace v roztoku vzorku v µg/ml porovnáním s kalibrační křivkou (5.6.2).

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

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

kde:

c = koncentrace methylbenzochátu v roztoku vzorku v g/ml

m = hmotnost navážky vzorku v g.

7. **Ověření výsledků**

7.1 *Identita*

Identita analytu může být potvrzena opakovaným stanovením s přidavkem nebo pomocí detektoru diodového pole, který umožňuje porovnání spektra extraktu vzorku se spektrem kalibračního roztoku (3.7.3) obsahujícího 10 µg/ml methylbenzochátu.

7.1.1 *Opakované stanovení s přidavkem (co-chromatography)*

Extrakt vzorku se obohatí přidáním vhodného množství pracovního standardního roztoku (3.7.2). Množství přidaného methylbenzochátu musí být podobné jako odhadovaný obsah methylbenzochátu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku methylbenzochátu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchylovat 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 přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor diodového pole se udává obvykle ±2 nm;
- při vlnové délce mezi 220 a 350 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 absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže odchylka mezi dvěma spektry nikde nepřesahuje 15 % absorpance standardního analytu;
- při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních v této části spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nikde nepřesahuje 15 % absorpance 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: 10 % relat. z hodnoty vyššího výsledku při obsahu methylbenzochátu od 4,0 do 20 mg/kg.

7.3 *Výtěžnost*

Výtěžnost pro obohacený vzorek musí být nejméně 90 %.

8. **Výsledky kruhových testů**

V deseti laboratořích bylo zkoušeno pět vzorků. U každého vzorku byly provedeny dvě zkoušky.

	Slepý vzorek krmiva	Sypké krmivo 1	Pelety 1	Sypké krmivo 2	Pelety 2
průměr (mg/kg)	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s _r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Slepý vzorek krmiva	Sypké krmivo 1	Pelety 1	Sypké krmivo 2	Pelety 2
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

ND = nezjištěno

s_r = standardní odchylka opakovatelnosti

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti v %

s_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti v %.

B. STANOVENÍ OLACHINDOXU

2-[N-2'-(hydroxyethyl)karbamoyl]-3-methylchinoxalin-N¹,N⁴-dioxid

1. Účel a rozsah

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

2. Princip

Vzorek se extrahuje směsí vody a methanolu. Obsah olachindoxu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi za použití UV detektoru.

3. Chemikálie

3.1 Methanol.

3.2 Methanol, pro HPLC.

3.3 Voda, pro HPLC.

3.4 Mobilní fáze pro HPLC.

Směs vody (3.3) a methanolu (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardní látka: čistý olachindox 2-[N-2'-(hydroxyethyl)karbamoyl]-3-methylchinoxalin-N¹,N⁴-dioxid, E 851.

3.5.1 Olachindox, základní standardní roztok, 250 µg/ml

Do 200 ml odměrné baňky se naváží 50 mg olachindoxu (3.5) s přesností na 0,1 mg a přidá se asi 190 ml vody. Baňka se postaví na 20 minut do ultrazvukové lázně (4.1). Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschová v chladničce. Tento roztok se musí připravovat čerstvý každý měsíc.

3.5.2 Olachindox, pracovní standardní roztok, 25 µg/ml

10,0 ml základního standardního roztoku (3.5.1) se převede do 100 ml odměrné baňky, doplní se po značku mobilní fází (3.4) a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschová v chladničce. Tento roztok se musí připravovat denně čerstvý.

3.5.3 Kalibrační roztoky

Do sady 50 ml odměrných baněk se odpipetuje 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 a 20,0 ml pracovního standardního roztoku (3.5.2). Doplní se po značku mobilní fází (3.4) a promíchá. Baňky se obalí hliníkovou fólií. Tyto roztoky odpovídají 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 a 10,0 µg/ml olachindoxu.

Tyto roztoky se musí připravovat denně čerstvé.