

	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.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Ultrazvuková lázeň.
- 4.2 Mechanické míchací zařízení.
- 4.3 Zařízení HPLC s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou nebo s detektorem diodového pole.
- 4.3.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm × 4 mm, C₁₈, náplň 10 μm nebo obdobná.
- 4.4 Membránové filtry, 0,45 μm.

5. Postup

Poznámka: Olachindox je citlivý na světlo. Všechny postupy se musí provádět při tlumeném světle nebo v nádobách z tmavého skla.

5.1 Obecné pokyny

- 5.1.1 Provede se zkouška slepého vzorku krmiva pro kontrolu, zda neobsahuje olachindox nebo jiné rušivé látky.
- 5.1.2 Zkouška na výtěžnost se provede na slepém vzorku krmiva, ke kterému bylo přidáno takové množství olachindoxu, které odpovídá obsahu ve vzorku. Pro obohacení na úroveň 50 mg/kg se odpipetuje 10,0 ml základního standardního roztoku (3.5.1) do 250 ml kónické baňky a roztok se odpaří na objem asi 0,5 ml. Přidá se 50 g slepého vzorku krmiva, řádně se promíchá a nechá se 10 minut odstát, přičemž se ještě několikrát promíchá. Dále se pokračuje s extrakcí podle bodu 5.2.

Poznámka: Pro účely této metody je slepý vzorek krmiva podobného typu jako zkoušený vzorek a nesmí být zjištěn olachindox.

5.2 Extrakce

Navází se přibližně 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přenese se do kónické baňky o obsahu 1 000 ml, přidá se 100 ml methanolu (3.1) a baňka se umístí na pět minut do ultrazvukové lázně (4.1). Přidá se 410 ml vody a ponechá se v ultrazvukové lázni dalších 15 minut. Baňka se vyjme z ultrazvukové lázně, dále se třepe 30 minut na míchacím zařízení (4.2) a potom se přefiltruje složeným filtrem. 10,0 ml filtrátu se přenese do 20 ml odměrné baňky, doplní se vodou po značku a promíchá. Poměrná část se přefiltruje membránovým filtrem (4.4). (viz bod 9 Poznámka). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry:

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

Analytická kolona (4.3.1)	směs vody (3.3) a methanolu (3.2), 900 + 100 (V + V)
Mobilní fáze (3.4):	
Průtok:	1,5–2 ml/min
Detekční vlnová délka:	380 nm
Objem nástřiku:	20 μl–100 μl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.5.3), který obsahuje 2,5 μg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik každého kalibračního roztoku (3.5.3) a změří se průměrná hodnota výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením průměrných hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v μg/ml.

5.3.3 Roztok vzorku

Provede se několik nástřiků extraktu vzorku (5.2) při použití stejného objemu jako u kalibračních roztoků a změří se průměrná hodnota výšky (plochy) píků olachindoxu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píků olachindoxu v roztoku vzorku se stanoví koncentrace v roztoku vzorku v $\mu\text{g/ml}$ porovnáním s kalibrační křivkou (5.3.2).

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

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

kde:

c = koncentrace olachindoxu v extraktu vzorku (5.2) v $\mu\text{g/ml}$

m = hmotnost navážky vzorku v g (5.2).

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 (5.2) a kalibračního roztoku (3.5.3), obsahujícího 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1 Opakované stanovení s přidavkem (co-chromatography)

Extrakt vzorku (5.2) se obohatí přidavkem přiměřeného množství kalibračního roztoku (3.5.3). Množství přidaného olachindoxu musí odpovídat množství olachindoxu nalezeného v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku olachindoxu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině jeho výšky musí být v rozmezí $\pm 10\%$ původní šířky píku olachindoxu v neobohaceném extraktu vzorku.

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 obvykle $\pm 2\text{ nm}$;
- při vlnové délce mezi 220 a 400 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;
- při vlnové délce mezi 220 a 400 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 na stejném vzorku nesmí přesáhnout 15 % relat. z vyššího výsledku při obsahu olachindoxu mezi 10 a 200 mg/kg .

7.3 Výtěžnost

Výtěžnost pro obohacený slepý vzorek krmiva musí být nejméně 90 %.

8. **Výsledky kruhových testů**

V rámci ES byly provedeny kruhové testy, při nichž až 13 laboratoří zkoušelo čtyři vzorky krmiva pro selata, včetně jednoho slepého vzorku. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
průměr (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S _r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S _R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV _r (%)	—	5,6	4,3	6,7
CV _R (%)	—	11,1	8,9	8,8
Deklarovaný obsah (mg/kg)	—	15	50	100
výtěžnost %	—	97,3	96,0	95,4

L = počet laboratoří

n = počet jednotlivých hodnot

S_r = standardní odchylka opakovatelnosti

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti.

9. **Poznámka**

Ačkoliv tato metoda nebyla ověřena pro krmiva obsahující více než 100 mg/kg olachindoxu, je možné obdržet uspokojivé výsledky menší navázkou vzorku a/nebo zředěním extraktu (5.2) tak, aby se dosáhlo koncentrace v rozsahu kalibrační křivky (5.3.2).

C. STANOVENÍ OBSAHU AMPROLIA

1-[4-amino-2-propyl-pyrimidinyl)-metyl]-2-picoliniumchlorid hydrochlorid

1. **Účel a rozsah**

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

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje směsí methanolu a vody. Po zředění mobilní fází a membránové filtraci se obsah amprolia stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s výměnou kationtů a UV detekcí.

3. **Chemikálie**

3.1 Methanol.

3.2 Acetonitril, pro HPLC.

3.3 Voda, pro HPLC.

3.4 Roztok dihydrogenfosforečnanu sodného, c = 0,1 mol/l.

13,80 g dihydrogenfosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (3.3) v odměrné baňce o objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.3) po značku a promíchá.