

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_f (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV_f (%)	—	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_f = standardní odchylka opakovatelnosti

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_f = 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.

- 3.5 Roztok chloristanu sodného, $c = 1,6 \text{ mol/l}$.
- 224,74 g chloristanu sodného se rozpustí ve vodě (3.3) v odměrné baňce o objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.3) po značku a promíchá.
- 3.6 Mobilní fáze pro HPLC (viz poznámka 9.1).
- Směs acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Roztok se před použitím přefiltruje přes membránový filtr 0,22 μm (4.3) a odplyní (např. v ultrazvukové lázni (4.4) po dobu nejméně 15 minut).
- 3.7 Standardní látka: amprolium, čisté, 1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)-methyl]-2-picoliniumchlorid hydrochlorid, E 750 (viz 9.2).
- 3.7.1 Základní standardní roztok amprolia, 500 $\mu\text{g/ml}$
- Do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg amprolia (3.7), rozpustí se v 80 ml methanolu (3.1) a vloží se na 10 minut do ultrazvukové lázně (4.4). Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá. Roztok je při teplotě $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ stálý jeden měsíc.
- 3.7.2 Amprolium, pracovní standardní roztok, 50 $\mu\text{g/ml}$
- Do 50 ml odměrné baňky se napipetuje 5,0 ml základního standardního roztoku (3.7.1), doplní se po značku extrakční směsí (3.8) a promíchá. Roztok je při teplotě $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$ stálý jeden měsíc.
- 3.7.3 Kalibrační roztoky
- Do sady 50 ml odměrných baněk se napipetuje 0,5, 1,0 a 2,0 ml pracovního standardního roztoku (3.7.2). Doplní se po značku mobilní fází (3.6) a promíchá. Tyto roztoky obsahují 0,5, 1,0 a 2,0 μg amprolia v 1 ml. Tyto roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.
- 3.8 Extrakční směs.
- Směs methanolu (3.1) a vody, 2 + 1 (v + v).
4. **Přístroje a pomůcky**
- 4.1 Zařízení HPLC s dávkovacím systémem pro injektované objemy 100 μl .
- 4.1.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm \times 4 mm, katex Nucleosil 10 SA, náplň 5 nebo 10 μm , nebo obdobná.
- 4.1.2 UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor diodového pole.
- 4.2 Membránový filtr, materiál PTFE, velikost pórů 0,45 μm .
- 4.3 Membránový filtr, 0,22 μm .
- 4.4 Ultrazvuková lázeň.
- 4.5 Mechanické nebo magnetické míchací zařízení.
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 za účelem kontroly, že ve vzorku není přítomno amprolium ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva je podobného složení jako zkoušený vzorek a nesmí být zjištěno amprolium ani rušivé látky.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Zkouška na výtěžnost se provede na slepém vzorku krmiva, ke kterému bylo přidáno takové množství amprolia, které odpovídá množství amprolia ve zkoušeném vzorku. Pro obohacení na obsah 100 mg/kg se převede 10,0 ml základního standardního roztoku (3.7.1) do 250 ml kónické baňky a roztok se odpaří na přibližně 0,5 ml. Poté 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 amprolia, 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 a premixy (obsah amprolia < 1 %)

Podle obsahu amprolia se do 500 ml kónické baňky naváží 5–40 g vzorku s přesností na 0,01 g a přidá se 200 ml extrakční směsi (3.8). Baňka se vloží na 15 minut do ultrazvukové lázně (4.4). Poté se vyjme a 1 hodinu třepa nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4.5). Alikvotní část extraktu se zředí mobilní fází (3.6) na obsah amprolia 0,5–2 µg/ml a promíchá se (viz poznámka 9.3). 5–10 ml tohoto naředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (4.2). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.3).

5.2.2 Premixy (obsah amprolia ≥ 1 %)

Podle obsahu amprolia se do 500 ml kónické baňky naváží 1–4 g premixu s přesností na 0,001 g a přidá se 200 ml extrakční směsi (3.8). Baňka se vloží na 15 minut do ultrazvukové lázně (4.4). Poté se vyjme a 1 hodinu třepa nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4.5). Alikvotní část extraktu se zředí mobilní fází (3.6) na obsah amprolia mezi 0,5–2 µg/ml a promíchá se. 5–10 ml tohoto zředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (4.2). 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.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.1.1): 125 mm × 4 mm, katex Nucleosil 10 SA, náplň 5 nebo 10 µm nebo obdobná

Mobilní fáze (3.6): směs acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Průtok: 0,7–1 ml/min

Detekční vlnová délka: 264 nm

Objem nástřiku: 100 µl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.7.3), který obsahuje 1,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek pík a konstantních retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik každého kalibračního roztoku (3.7.3) a změří se průměrná hodnota výšek (ploch) pík pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením průměrných hodnot výšek nebo ploch pík 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 zjistí se průměrná hodnota výšek (ploch) pík amprolia.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) pík amprolia u roztoku vzorku se podle kalibrační křivky (5.3.2) stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml.

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

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

kde:

V = objem extrakční směsi (3.8) v ml podle 5.2 (tj. 200 ml)

c = koncentrace amprolia v extraktu vzorku (5.2) v µg/ml

f = faktor ředění podle 5.2

m = hmotnost navážky vzorku v g.

7. Ověření výsledků

7.1 Identita

Identitu analytů lze potvrdit opakovaným stanovením s přidavkem (co-chromatography) nebo pomocí detektoru diodového pole, přičemž se porovnávají spektra roztoku vzorku (5.2) a kalibračního roztoku (3.7.3) obsahujícího 2,0 µg/ml.

7.1.1 Opakované stanovení s přidavkem (co-chromatography)

K roztoku vzorku (5.2) se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.7.3). Přidané množství amprolia musí odpovídat obsahu amprolia v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku amprolia, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchylovat od šířky původního píku amprolia v neobohaceném extraktu vzorku 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 210 a 320 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 absorpce. 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 210 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 absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorpance spektra ve vrcholu píku.

Není-li některé z těchto kritérií splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit

- 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu amprolia mezi 25 mg/kg a 500 mg/kg,
- 75 mg/kg u obsahu amprolia mezi 500 mg/kg a 1 000 mg/kg,
- 7,5 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu amprolia vyššího než 1 000 mg/kg.

7.3 Výtěžnost

Pro obohacený (slepý) vzorek musí být výtěžnost nejméně 90 %.

8. **Výsledky kruhových testů**

Při kruhových testech byla zkoušena tři krmiva pro drůbež (vzorky 1–3), minerální krmivo (vzorek 4) a premix (vzorek 5). Výsledky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce.

	vzorek 1 (slepé krmivo)	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
průměr (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r (mg/kg)	—	2,26	3,57	178	550
CV_r (%)	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R (mg/kg)	—	2,95	11,8	266	760
CV_R (%)	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Deklarovaný obsah (mg/kg)	—	50	200	5 000	25 000

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**

- 9.1 Obsahuje-li vzorek thiamin, objeví se pík thiaminu v chromatogramu krátce před píkem amprolia. Při použití této metody by se amprolium a thiamin měly oddělit. Nejsou-li amprolium a thiamin separovány kolonou (4.1.1) použitou při této metodě, upraví se mobilní fáze (3.6) nahrazením až 50 % acetonitrilu methanolem.
- 9.2 Podle britského lékopisu vykazuje spektrum roztoku amprolia ($c = 0,02$ mol/l) v kyselině chlorovodíkové ($c = 0,1$ mol/l) maxima při 246 nm a 262 nm. Absorbance by měla činit 0,84 při 246 nm a 0,80 při 262 nm.
- 9.3 Extrakt by se vždy měl ředit mobilní fází, jelikož jinak se retenční čas píku amprolia značně posouvá změnami iontové síly.

D. STANOVENÍ OBSAHU CARBADOXU

Methyl-3-(2-chinoxalinylmethylen)-carbazat- N^1, N^4 -dioxid

1. **Účel a rozsah**

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

2. **Princip**

Vzorek se zvlhčí vodou a poté se extrahuje směsí methanolu a acetonitrilu. U krmiv se aliquotní část extraktu po filtraci přečistí na koloně s oxidem hlinitým. Extrakt z premixů a přípravků se přímo ředí na vhodnou koncentraci směsí vody, methanolu a acetonitrilu. Obsah carbadoxu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. **Chemikálie**

3.1 Methanol.

3.2 Acetonitril, pro HPLC.