

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.

- 3.3 Kyselina octová, w = 100 %.
- 3.4 Oxid hlinitý: neutrální, stupeň aktivity I.
- 3.5 Směs methanolu a acetonitrilu 1 + 1 (v + v).
500 ml methanolu (3.1) se smíchá s 500 ml acetonitrilu (3.2).
- 3.6 Kyselina octová, σ = 10 %.
10 ml kyseliny octové (3.3) se smíchá se 100 ml vody.
- 3.7 Octan sodný.
- 3.8 Voda, pro HPLC.
- 3.9 Octanový tlumivý roztok, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.
0,82 g octanu sodného (3.7) se rozpustí v 700 ml vody (3.8) a kyselinou octovou (3.6) se upraví pH na 6,0. Roztok se převede do odměrné baňky o objemu 1 000 ml, doplní se vodou (3.8) po značku a promíchá.
- 3.10 Mobilní fáze pro HPLC.
825 ml octanového tlumivého roztoku (3.9) se smíchá se 175 ml acetonitrilu (3.2).
Roztok se přefiltruje přes membránový filtr 0,22 μ m (4.5) a odplyní se (např. v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut).
- 3.11 Standardní látka.
Čistý carbadox: Methyl-3-(2-chinoxalinylmethylen)-carbazat-N¹,N⁴-dioxid, E 850.
- 3.11.1 Carbadox, základní standardní roztok, 100 μ g/ml (viz poznámka v bodě 5 Postup):
Do 250 ml odměrné baňky se naváží 25 mg carbadoxu (3.11) s přesností na 0,1 mg. Rozpustí se ve směsi methanolu a acetonitrilu (3.5) v ultrazvukové lázni (4.7). Po působení ultrazvuku se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní se směsí methanolu a acetonitrilu (3.5) po značku a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií (nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla) a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.
- 3.11.2 Kalibrační roztoky
Do sady 100 ml odměrných baněk se přenese 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml základního standardního roztoku (3.11.1). Přidá se po 30 ml vody, doplní se po značku směsí methanolu a acetonitrilu (3.5) a promíchá. Baňky se obalí hliníkovou fólií. Tyto roztoky obsahují 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 μ g carbadoxu v 1 ml.
Kalibrační roztoky se připravují čerstvé před použitím.
Poznámka: Pro stanovení carbadoxu v krmivech obsahujících méně než 10 mg/kg se musí připravovat kalibrační roztoky s koncentrací nižší než 2,0 μ g/ml.
- 3.12 Směs vody a směsi methanolu a acetonitrilu (3.5), 300 + 700 (v + v).
300 ml vody se smíchá se 700 ml směsí methanolu a acetonitrilu (3.5).
4. **Přístroje a pomůcky**
- 4.1 Laboratorní mechanické nebo magnetické míchací zařízení.
- 4.2 Filtrační papír ze skleněných vláken (Whatman GF/A nebo obdobný).

- 4.3 Skleněná kolona (délka 300–400 mm, vnitřní průměr přibližně 10 mm) s fritou a vypouštěcím kohoutem.

Poznámka: Lze použít i skleněnou kolonu s kohoutem a kónicky zúženou skleněnou kolonu; v tom případě se do spodní části kolony vloží malá zátku ze skelné vaty a utěsní se pomocí skleněné tyčinky.

- 4.4 Zařízení HPLC s dávkovacím systémem pro injektované objemy 20 µl.

- 4.4.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii: 300 mm × 4 mm, C₁₈, náplň 10 µm nebo obdobná.

- 4.4.2 UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor diodového pole s měřicím rozsahem 225–400 nm.

- 4.5 Membránový filtr, 0,22 µm.

- 4.6 Membránový filtr, 0,45 µm.

- 4.7 Ultrazvuková lázeň.

5. Postup

Poznámka: Carbadox je citlivý na světlo. Celý postup se musí provádět při tlumeném světle nebo je třeba použít nádobí z tmavého skla nebo sklo obalit hliníkovou fólií.

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 není přítomen ani carbadox, ani rušivé látky. Slepý vzorek krmiva má podobné složení jako zkoumaný vzorek a nesmí být zjištěn carbadox ani rušivé látky.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost

Zkouška na výtěžnost se provede na slepém vzorku krmiva (5.1.1), ke kterému bylo přidáno takové množství carbadoxu, které odpovídá množství carbadoxu ve zkoušeném vzorku. Pro obohacení na obsah 50 mg/kg se 5,0 ml základního standardního roztoku (3.11.1) převede do 200 ml kónické baňky. Roztok se v proudu dusíku odpaří na přibližně 0,5 ml. Přidá se 10 g slepého vzorku krmiva, promíchá se a po deseti minutách se může začít s extrakcí (5.2).

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 carbadoxu, 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 200 ml kónické baňky se naváží 10 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přidá se 15,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 35,0 ml směsi methanolu a acetonitrilu (3.5), baňka se uzavře a 30 minut se protřepává nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4.1). Roztok se přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken (4.2). Tento roztok se použije k čištění (5.3).

5.2.2 Premixy (0,1–2,0 %)

Do 200 ml kónické baňky se naváží 1 g nemletého vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 15,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 35,0 ml směsi methanolu a acetonitrilu (3.5), baňka se uzavře a 30 minut se protřepává nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4.1). Roztok se přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken (4.2).

Alikvotní část filtrátu se odpipetuje do 50 ml odměrné baňky. Přidá se 15,0 ml vody, doplní se po značku směsí methanolu a acetonitrilu (3.5) a promíchá. Koncentrace carbadoxu v konečném roztoku je přibližně 10 µg/ml. Alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm (4.6).

Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.4).

5.2.3 Přípravky (> 2 %)

Do 250 ml kónické baňky se naváží 0,2 g nemletého vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 45,0 ml vody, promíchá se a nechá se 5 minut stát. Poté se přidá 105,0 ml směsi methanolu a acetonitrilu (3.5), baňka se uzavře a homogenizuje. Baňka se vloží na 15 minut do ultrazvukové lázně (4.7) a poté se 15 minut třepe nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4.1). Roztok se přefiltruje přes filtr ze skleněných vláken (4.2).

Alikvotní část filtrátu se zředí směsí vody, methanolu a acetonitrilu (3.12) tak, aby se získala koncentrace carbadoxu 10–15 µg/ml (pro 10 % přípravek je faktor ředění 10). Alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm (4.6).

Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.4).

5.3 Čištění

5.3.1 Příprava kolony s oxidem hlinitým

Do skleněné kolony (4.3) se naváží 4 g oxidu hlinitého (3.4).

5.3.2 Čištění vzorku

Na kolonu s oxidem hlinitým se nanese 15 ml přefiltrovaného extraktu (5.2.1) a první 2 ml eluátu se odstraní. Následujících 5 ml se zachycuje, alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm (4.6).

Dále se pokračuje se stanovením HPLC (5.4).

5.4 Stanovení HPLC

5.4.1 Parametry

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

Kolona pro kapalinovou chro- 300 mm × 4 mm, C₁₈, náplň 10 µm nebo obdobná matografii (4.4.1):

Mobilní fáze (3.10):	Směs octanového tlumivého roztoku (3.9) a acetonitrilu (3.2), 825 + 175 (v+v)
Průtok:	1,5–2 ml/min
Detekční vlnová délka:	365 nm
Objem nástřiku:	20 µl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.11.2), který obsahuje 5,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (ploch) píků a konstantních retenčních časů.

5.4.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik každého kalibračního roztoku (3.11.2) a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením průměrných hodnot výšek (ploch) píků proti příslušným koncentracím v µg/ml.

5.4.3 Roztok vzorku

Extrakt ze vzorku ((5.3.2) pro krmiva, (5.2.2) pro premixy a (5.2.3) pro přípravky) se opakovaně nástřikuje a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píku carbadoxu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píků carbadoxu v roztoku vzorku se porovnáním s kalibrační křivkou (5.4.2) stanoví koncentrace carbadoxu v roztoku vzorku v µg/ml.

6.1 *Krmiva*

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

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kde:

c = koncentrace carbadoxu v extraktu vzorku (5.3.2) v $\mu\text{g/ml}$

V_1 = objem extrakční směsi (tj. 50 ml)

m = hmotnost navážky vzorku v g.

6.2 *Premixy a přípravky*

Obsah carbadoxu (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 carbadoxu v extraktu vzorku (5.2.2 nebo 5.2.3) v $\mu\text{g/ml}$

V_2 = objem extrakční směsi (tj. 50 ml pro premixy; 150 ml pro přípravky)

f = faktor ředění podle 5.2.2 (premixy) nebo 5.2.3 (přípravky)

m = hmotnost navážky vzorku v g.

7. **Ověření výsledků**7.1 *Identita*

Identitu analytu lze potvrdit opakovaným stanovením s přidávkem (co-chromatography) nebo pomocí detektoru diodového pole, přičemž se srovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (3.11.2) obsahujícího 10,0 $\mu\text{g/ml}$ carbadoxu.

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

K extraktu vzorku se přidá vhodné množství kalibračního roztoku (3.11.2). Přidané množství carbadoxu musí odpovídat obsahu carbadoxu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku carbadoxu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se může odchylovat od šířky původního píku carbadoxu nejvýše o $\pm 10\%$.

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 225 a 400 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 225 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 absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry 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 téhož vzorku nesmí při obsahu carbadoxu 10 mg/kg překračovat 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

7.3 Výtěžnost

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

8. Výsledky kruhových testů

Při kruhových testech bylo 8 laboratořemi zkoušeno 6 krmiv, 4 premixy a 3 přípravky. U každého vzorku byly provedeny dvě zkoušky. (Přesnější údaje o těchto kruhových testech viz *Journal of the AOAC*, Volume 71, 1998, s. 484–490.) Výsledky (s výjimkou odlehých hodnot) jsou shrnuty v níže uvedené tabulce:

Tabulka 1

Výsledky kruhových testů u krmiv

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
průměr (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Deklarovaný obsah (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabulka 2

Výsledky kruhových testů u premixů a přípravků

	Premixy				Přípravky		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
průměr (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Deklarovaný obsah (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

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.