

ДИРЕКТИВА 1999/27/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 20 април 1999 година

относно въвеждане на методи на Общността за анализ при дозирането на ампролиум, диклазурил и карбадокс във храните за животни за изменение на Директиви 71/250/ЕИО, 73/46/ЕИО и за отмяна на Директива 74/203/ЕИО

(Текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на методи на Общността за вземани на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ¹, последно изменена с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция и по-специално член 2 от нея,

(1) като има предвид, че Директива 70/373/ЕИО предвижда, че официалният контрол на храните за животни за проверка спазването на изискванията, които следват от законовите, подзаконовите и административни разпоредби, регулиращи качеството и състава им, трябва да се извършва, като се използват методи на Общността за вземане на проби и на анализ;

(2) като има предвид, че Директива 70/524/ЕИО на Съвета от 23 ноември 1970 г. относно добавките във храните за животни ², последно изменена с Регламент 45/1999 на Комисията ³, предвижда, че съдържанието на ампролиум и диклазурил трябва да бъде посочено на етикетите, когато тези субстанции са добавени към премиксите и храните за животни; като има предвид, че разрешаването на карбадокса за употреба като фуражна добавка е отменено с регламент 2788/98 на Комисията от 22 декември 1998 г. за изменение на Директива 70/524/ЕИО на Съвета относно добавките във храните за животни, по отношение на отмяната на разрешаването на определени стимулатори на растежа ⁴, и че е необходим официален контрол върху евентуалната неправомерна употреба на забранени субстанции;

(3) като има предвид, че трябва да се въведат методи за анализ на Общността за проверката на тези субстанции;

(4) като има предвид, че първата Директива 71/250/ЕИО на Комисията от 15 юни 1971 г. за въвеждане на методи на Общността за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ⁵, последно изменена с Директива 98/54/ЕО ⁶, установява методи за анализ, *inter alia*, за определяне на синапеното масло и теобромина; като има предвид, че описаните методи вече не са валидни

¹ ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

² ОВ L 270, 14.12.1970 г., стр. 1.

³ ОВ L 6, 12.1.1999 г., стр. 3.

⁴ ОВ L 347, 23.12.1998 г., стр. 31.

⁵ ОВ L 155, 12.7.1971 г., стр. 13.

⁶ ОВ L 208, 24.7.1998 г., стр. 49.

за тяхното предназначение, предвид напредъка в научно-техническото познание; като има предвид, че е следователно целесъобразно да се заличат тези методи;

(5) като има предвид, че четвъртата Директива 73/46/ЕИО на Комисията от 5 декември 1972 г. за въвеждане на методи за анализ на Общността за официалния контрол на храните за животни ⁷, последно изменена с Директива 98/54/ЕО, установява методи за анализ, *inter alia*, за определяне на ретинол (витамин А); като има предвид, че описаният метод вече не е валиден за предназначението си, предвид напредъка в научно-техническото познание; като има предвид, че е следователно целесъобразно да се заличи методът за ретинола;

(6) като има предвид, че петата Директива 74/203/ЕИО на Комисията от 25 март 1974 г. за въвеждане на методи за анализ на Общността за официалния контрол на храните за животни ⁸, последно изменена с Директива 81/680/ЕИО ⁹, установява методи за анализ за определяне на скорбяла и скорбялоразграждащи продукти с високо молекулно тегло във храните за животни, съдържащи цвеклови сушени резанки, цвеклов пулп, сушени цвеклови върхове и листа, картофен пулп, сушени дрожди, богати на инулин продукти или пръжки, ампролиум, етопабат, динитолмид, никарбазин и менадион (витамин К3); като има предвид, че всички описани в тази директива методи вече не са валидни за тяхното предназначение, предвид напредъка в научно-техническото познание; като има предвид, че е следователно целесъобразно да се отмени тази директива;

(7) като има предвид, че мерките предвидени в настоящата директива са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки постановяват провеждането на анализите с оглед на официалния контрол на съдържанията на ампролиум, диклазурил и карбадокс в храните за животни и премиксите да се извършва, като се използват методите, изложени в приложението тук.

Член 2

Директива 71/250/ЕИО се изменя, както следва:

1. В член 1, думите „синапено масло” и „теобромин” се заличават.
2. Точки 8 и 13 от приложението се заличават.

Член 3

Директива 73/46/ЕИО се изменя, както следва:

⁷ ОВ L 83, 30.3.1973 г., стр. 21.

⁸ ОВ L 108, 22.4.1974 г., стр. 7.

⁹ ОВ L 246, 29.8.1981 г., стр. 32.

1. Член 2 се заличава.
2. Приложение II се заличава.

Член 4

Директива 74/203/ЕИО се отменя.

Член 5

Държавите-членки въвеждат необходимите закони, подзаконови и административни разпоредби, за да приведат своето законодателство в съответствие с настоящата директива, не по-късно от 31 октомври 1999 г. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

Те прилагат мерките от 1 ноември 1999 г.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условието и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

Член 6

Настоящата директива влиза в сила на двадесетия ден след публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 7

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 20 април 1999 година.

За Комисията:
Franz FISCHLER
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

Част А

ДОЗИРАНЕ НА АМПРОЛИУМ

1-((4-амино-2-пропилпиримидин-5-ил)метил)-2-метил-пиридиinium хлорид хидрохлорид

1. Цел и обхват

С този метод се определя съдържанието на ампролиум във храните за животни и премиксите. Границата на откриване е 1 mg/kg, а границата на определяне е 25 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се извлича със смес „метанол-вода”. След разреждане с мобилна фаза и филтрация с мембранен филтър, съдържанието на ампролиума се определя чрез високо-ефективна течна хроматография (HPLC) с катионен обмен, с помощта на UV детектор.

3. Реактиви

3.1. Метанол.

3.2. Ацетонитрил, клас HPLC

3.3. Вода, клас HPLC

3.4. Разтвор на натриев дихидроген фосфат, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Разтворете във вода (3.3) 13,80 g натриев дихидроген фосфат монохидрат в мерителна колба от 1000 ml, допълнете до маркировката с вода (3.3) и разбъркайте.

3.5. Разтвор на натриев перхлорат, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Разтворете 224,74 g натриев перхлорат монохидрат във вода (3.3) в мерителна колба от 1000 ml, допълнете с вода (3.3) до маркировката и разбъркайте.

3.6. Мобилна фаза за HPLC (виж забележка 9.1).

Смес на ацетонитрил (3.2), разтвор на натриев дихидроген фосфат (3.4) и разтвор на натриел перхлорат (3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v +v)}$. Преди употреба, филтрирайте през мембранен филтър $0.22 \mu\text{m}$ (4.3) и обезгазете разтвора (напр.в ултразвукова вана (4.4) в продължение най-малко на 15 минути).

3.7. Стандартна субстанция: чист ампролиум, 1-((4-амино-2-пропилпиримидин-5-ил)метил)-2-метил-пиридиinium хлорид хидрохлорид, E 750 (вж.9.2).

3.7.1. Основен стандартен разтвор на ампролиум, 500 $\mu\text{g/ml}$

Претеглете 50 mg ампролиум (3.7) с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 100 ml, разтворете в 80 ml метанол (3.1) и поставете колбата в ултразвукова вана (4.4) за 10 минути. След обработката с ултразвук, охладете разтвора до стайна температура, допълнете с вода до маркировката, и разбъркайте. При температура $\leq 4^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.7.2. Междинен стандартен разтвор на ампролиум, 50 $\mu\text{g/ml}$

Отмерете с пипета 5 ml от основния стандартен разтвор (3.7.1) в мерителна колба от 50 ml, допълнете до маркировката с екстрахиращ разтворител (3.8) и разбъркайте. При температура $\leq 4^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.7.3. Калибрационни разтвори

Прехвърлете съответно 0,5, 1 и 2 ml от междинния стандартен разтвор (3.7.2) в серия от 50-милилитрови мерителни колби. Допълнете с мобилна фаза (3.6) до маркировката и разбъркайте. Тези разтвори отговарят съответно на 0,5, 1 и 2 μg ампролиум на ml. Разтворите трябва да бъдат прясно приготвени преди употреба.

3.8. Екстрахиращ разтворител

Смес метанол (3.1) - вода, 2 + 1 (v + v).

4. Апаратура

4.1. Оборудване за HPLC с инжекционна система, подходяща за инжектиране на обеми от 100 μl .

4.1.1. Колона за течен хроматографски анализ 125 mm x 4 mm, катионен пълнеж Nucleosil 10 SA за йонен обмен, опаковка от 10 μm или еквивалент.

4.1.2. UV детектор с настройка на дължината на вълната или диоден детектор.

4.2. Мембранен филтър, материал PTFE, 0,45 μm .

4.3. Мембранен филтър, 0,22 μm .

4.4. Ултразвукова вана.

4.5. Механичен вибратор или магнитна бъркалка.

5. Процедура

5.1. Общо описание

5.1.1. Празна проба фураж

За изпълнението на теста за извличане (5.1.2), следва да се анализира празна проба фураж за да се провери за наличие на ампролиум и пречещи субстанции.

Фуражът от празната проба трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба, и в него не трябва да бъдат открити ампролиум или пречещи субстанции.

5.1.2. Тест за извличане

Тестът за извличане се извършва, като се анализира празната проба фураж, обогатена чрез прибавяне на такова количество ампролиум, подобно на наличното в изследваната проба. За да обогатите при ниво 100 mg/kg, пресипете 10 ml от основния стандартен разтвор (3.7.1) в конична колба от 250 ml и изпарете разтвора, докато получите приблизително 0,5 ml. Добавете 50 g празна проба фураж, смесете добре и оставете да престои 10 минути, като разбърквате отново няколко пъти, преди да преминете към екстракцията (5.2).

Като алтернатива, ако не разполагате с фураж за празната проба, подобен по вид на този от изследваната проба (виж 5.1.1), тестът за извличане може да се извърши чрез стандартен метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество ампролиум, което е близко до вече съдържащото се в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като извличането се калкулира чрез изваждане.

5.2. Екстракция

5.2.1. Премикси (съдържание < 1 % ампролиум) и фуражи

Претеглете с точност до 0,01 mg от 5 g до 40 g от изследваната проба, в зависимост от съдържанието на ампролиум, в конична колба от 500 ml, и добавете 200 ml екстрахиращ разтворител (3.8). Поставете колбата в ултразвукова вана (4.4) и я оставете да престои 15 минути, след което извадете колбата от ултразвуковата вана и я поставете за 1 час на вибратор или разбърквайте с магнитната бъркалка (4.5). Разрежете с мобилна фаза една аликвотна част от екстракта до получаване на съдържание на ампролиум от 0,5 до 2 µg/ml и разбъркайте (виж забележка 9.3). Филтрирайте 5 до 10 ml от този разреден разтвор през мембранен филтър (4.2). Преминете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.2.2. Премикси (съдържание ≥ 1 % ампролиум)

Претеглете с точност до 0,001 g от 1 до 4 g премикс, в зависимост от съдържанието на ампролиум, в конична колба от 500 ml, и добавете 200 ml екстрахиращ разтворител (3.8). Поставете колбата в ултразвукова вана (4.4) и я оставете да престои 15 минути, след което извадете колбата от ултразвуковата вана и я поставете за 1 час на вибратор или разбърквайте с магнитната бъркалка (4.5). Разрежете с мобилна фаза една аликвотна част от екстракта до получаване на съдържание на ампролиум от 0,5 до 2 µg/ml и разбъркайте. Филтрирайте 5 до 10 ml от този разреден разтвор през мембранен филтър (4.2). Преминете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.3. Определяне чрез HPLC

5.3.1. Параметри

Следните условия се посочват като указващи; може да се използват други, при условие, че дават равностойни резултати:

Колона за течен хроматографски анализ (4.1.1): 125 мм х 4 мм, катионен пълнеж Nucleosil 10 SA, опаковка 10 µm или еквивалент.

Мобилна фаза (3.6): Смес от ацетонитрил (3.2),
разтвор на натриев дихидроген фосфат (3.4) и разтвор на натриев
перхлорат (3.5), 450 + 450 + 100
(v + v + v).

Скорост на пропускане: 0,7 до 1 ml/min.

Дължина на детекция: 264 nm

Инжекционен обем: 100 µl

Проверете стабилността на хроматографската система, като инжектирате няколко пъти калибрационен разтвор (3.7.3), съдържащ 1,0 µg/ml, докато се постигнат постоянни височини на пиковите и времена на задържане.

5.3.2. Калибрираща графика

Инжектирайте от всеки калибрационен разтвор (3.10.3) по няколко пъти и определете средните височини на пиковите (площите) за всяка концентрация. Начертайте калибрираща графика, като използвате средните височини на пиковите (площите) на калибрационните разтвори за ординати, а съответстващите концентрации в µg/ml - за абсциси.

5.3.3. Разтвор на пробата

Инжектирайте екстракта от пробата за изследване (5.2) няколко пъти, като използвате същият обем, използван при калибрационните разтвори, и определете средната пикова височина (площ) на ампролиумовите пикове.

6. Изчисление на резултатите

От средната височина (площ) на пиковите на ампролиума от разтвора на пробата, като използвате калибриращата графика (5.3.2), определете концентрацията на разтвора на пробата в µg/ml.

Съдържанието на ампролиум w в mg/kg в пробата се изразява със следната формула:

$$w = \frac{V \cdot \beta \cdot f}{m} \text{ (mg/kg) където:}$$

V = обем на екстрахиращия разтворител (3.8) в ml, съгласно 5.2 (т.е. 200 ml)

β = концентрация на ампролиум в екстракта на пробата (5.2) в µg/ml

f = коефициент на разреждане по 5.2

m = масата в g на взетата за анализ част

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография, или като се използва диоден детектор, чрез който се сравняват спектрите на екстракта на пробата (5.2) и на калибрационния разтвор (3.7.3), съдържащ 2,0 µg/ml.

7.1.1. Ко-хроматография

Обогатява се екстракт от пробата (5.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (3.7.3). Количеството добавен ампролиум трябва да бъде близко до това, открито в екстракта на пробата.

След като се вземат под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта, следва да се увеличи само височината на ампролиумовия пик. Широчината на пика, при половината от височината, трябва да бъде в границите на ± 10 % от оригиналната широчина на ампролиумовия пик при необогатения екстракт от пробата.

7.1.2. Диодно детектиране

Резултатите се оценяват по следните критерии:

(а) Дължината на вълната при максимално абсорбиране на спектрите на пробата и спектрите на стандартите, регистрирана при максимума на пика на хроматограмата, трябва да бъде една и съща в рамките на границата, определена чрез разделителната способност на детектиращата система. При диодното детектиране, тя е обикновено в границите на ± 2 nm.

(б) В границите от 210 до 320 nm, регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите, не трябва да се различават за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10-100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между два спектъра при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ.

(в) В границите от 210 до 320 nm, спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10-100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между спектрите при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на спектъра на максимума на пика.

Ако един от тези критерии не е спазен, наличието на анализа не е потвърдено.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени върху същата проба, не трябва да превишава:

- 15 % спрямо по-високата стойност при съдържание на ампролиум от 25 mg/kg до 500 mg/kg;
- 75 mg/kg при съдържание на ампролиум между 500 mg/kg и 1000 mg/kg;
- 7,5 % спрямо по-високата стойност при съдържание на ампролиум над 1000 mg/kg.

7.3. Извличане

При обогатена (празна) проба, извличането трябва да бъде най-малко 90 %.

8. Резултати от паралелно изследване

Проведено беше паралелно изследване, при което бяха анализирани три фуража за домашни птици (проби 1-3), един минерален фураж (проба 4) и един премикс (проба 5). Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 1 (контролен фураж)	Проба 2	Проба 3	Проба 4	Проба 5
L	14	14	14	14	14
N	56	56	56	56	60
Средно (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
Номинално съдържание (mg/kg)	-	50	200	5 000	25 000
L = брой лаборатории N = брой отделни стойности S _r = стандартно отклонение на повторемостта CV _r = коефициент на изменение на повторемостта S _R = стандартно отклонение на възпроизводимостта CV _R = коефициент на изменение на възпроизводимостта					

9. Забележки

9.1. Ако пробата съдържа тиамин, неговият пик в хроматограмата се явява малко преди пика на ампролиума. Следвайки този метод, ампролиума и тиамина трябва да се разделят. Ако те не се разделят чрез колоната (4.1.1), използвана в настоящия метод, заменете до 50 % от частта на ацетонитрила в мобилната фаза (3.6) с метанол.

9.2. Съгласно Британската фармакопея, спектърът на ампролиумов разтвор (c=0,02 mol/l) в солна киселина (c=0,1 mol/l) показва максимуми при 246 nm и 262 nm. Абсорбцията възлиза на 0,84 при 246 nm и 0,80 при 262 nm.

9.3. Екстрактът винаги трябва да бъде разреден с мобилна фаза, тъй като в противен случай времето на задържане на ампролиумовия пик може значително да се измени, поради промени в йонната сила на разтвора.

Част Б

ДОЗИРАНЕ НА ДИКЛАЗУРИЛ

(+)-4-хлорфенил (2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил)фенил)-ацетонитрил.

1. Цел и обхват

Този метод се използва за определяне на диклазурил във храните за животни и премиксите. Границата на откриване е 0,1 mg/kg, а границата на определяне е 0,5 mg/kg.

2. Принцип

След прибавяне на вътрешен стандарт, пробата се екстрахира с подкислен метанол. При храните за животни, една аликвотна част от екстракта се пречиства в патрон за екстракция на твърда фаза C18. Диклазурият се отмива от патрона със смес от подкислен метанол и вода. След изпарение, остатъкът се разтваря в DMF/вода. При премиксите, екстрактът се изпарява и остатъкът се разтваря в DMF/вода. Съдържанието на диклазурил се определя чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с три-градиента обратна фаза, с помощта на UV детектор.

3. Реактиви

3.1. Вода, клас HPLC

3.2. Амониев ацетат

3.3. Тетрабутиламониум хидрогенсулфат (TBHS)

3.4. Ацетонитрил, клас HPLC

3.5. Метанол, клас HPLC

3.6. N,N-диметилформаид (DMF)

3.7. Солна киселина, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.8. Стандартна субстанция: диклазурил П-24: (+)-4-хлорфенил (2,6-дихлоро-4-(2,3,4,5-тетрахидро-3,5-диоксо-1,2,4-триазин-2-ил) фенил) ацетонитрил с гарантирана чистота, E 771.

3.8.1. Основен стандартен разтвор на диклазурил, 500 µg/ml

Претеглете 25 mg стандартна субстанция диклазурил (3.8) с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 50 ml. Разтворете в DMF (3.6), допълнете до маркировката с 31999L0027.doc – ЦПР - редактиран

DMF (3.6) и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте колба от янтарно стъкло, и я съхранете в хладилник. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.8.2. Стандартен разтвор на диклазурил, 50 $\mu\text{g/ml}$

Прехвърлете 5,00 ml от основния стандартен разтвор (3.8.1) в мерителна колба от 50 ml, допълнете до маркировката с DMF (3.6) и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте колба от янтарно стъкло, и я съхранете в хладилник. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.9. Субстанция вътрешен стандарт: 2,6 дихлоро- α -(4-хлорофенил)-4-(4,5 дихидро-3,5-диоксо-1,24-триазин-2(3H)-ил) α -метилбензен-ацетонитрил.

3.9.1. Основен разтвор на вътрешния стандарт, 500 $\mu\text{g/ml}$

Претеглете 25 mg субстанция вътрешен стандарт (3.9) с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 50 ml. Разтворете в DMF (3.6), допълнете до маркировката с DMF (3.6) и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте колба от янтарно стъкло, и я съхранете в хладилник. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.9.2. Разтвор на вътрешния стандарт, 50 $\mu\text{g/ml}$

Прехвърлете 5,00 ml от основния разтвор на вътрешния стандарт (3.9.1) в мерителна колба от 50 ml, допълнете до маркировката с DMF (3.6) и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте колба от янтарно стъкло, и я съхранете в хладилник. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.9.3. Разтвор на вътрешен стандарт за премикси, p/1000 mg/ml (p = номинално съдържание на диклазурил в премиксите, в mg/kg).

Отмерете p/10 mg субстанция вътрешен стандарт с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 100 ml, разтворете в DMF (3.6) в ултразвукова вана (4.6), допълнете до маркировката с DMF и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте колба от янтарно стъкло, и я съхранете в хладилник. При температура $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.10. Калибрационен разтвор 2 $\mu\text{g/ml}$.

Отмерете с пипета 2,00 ml от стандартния разтвор на диклазурил (3.8.2) и 2 ml разтвор на вътрешния стандарт в 50-милилитрова мерителна колба. Прибавете 16 ml DMF (3.6), допълнете до маркировката с вода, и разбъркайте. Разтворът трябва да бъде прясно приготвен преди употреба.

3.11. Патрон за екстракция на твърда фаза C18, напр. Bond Elut, размер: 1 cc, маса на сорбента: 100 mg.

3.12. Екстрахиращ разтворител: подкислен метанол

Отмерете с пипета 5,0 ml солна киселина (3.7) и смесете в 1000 ml метанол (3.5).

3.13. Мобилна фаза за HPLC

Елуиращ агент А: разтвор на амониев ацетат - тетрабутиламониум хидрогенсулфат.

3.13.1. Разтворете 5 г амониев ацетат (3.2) и 3,4 г ТБХС (3.) в 1000 ml вода (3.1) и разбъркайте.

3.13.2. Елуиращ агент Б: ацетонитрил (3.4).

3.13.3. Елуиращ агент В: метанол (3.5).

4. Апаратура

4.1. Механичен вибратор.

4.2. Оборудване за три-градиентна HPLC

4.2.1. Колона за течен хроматографски анализ, Hypersil ODS, опаковка от 3 μm , 100 мм x 4,6 мм, или еквивалент.

4.2.2. UV детектор с настройка на дължината на вълната или диоден детектор.

4.3. Вакуумен ротационен изпарител.

4.4. Мембранен филтър, 0,45 μm .

4.5. Вакуумен колектор.

4.6. Ултразвукова вана.

5. Процедура

5.1. Общо описание

5.1.1. Празна проба фураж

Празната проба фураж трябва да се анализира за да се провери за наличие на диклазурил и пречещи субстанции. Фуражът от празната проба трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба и при анализа не трябва да бъдат открити диклазурил или пречещи субстанции.

5.1.2. Тест за извличане

Тестът за извличане трябва да се извърши, като се анализира празна проба фураж, обогатена чрез прибавяне на такова количество диклазурил, което е близко до наличното в пробата за изследване. За да обогатите при ниво 1 mg/kg, към 50 g празна проба фураж прибавете 0,1 ml от основния стандартен разтвор (3.8.1),

разбъркайте добре и оставете да престои 10 минути, като разбъркате отново няколко пъти, преди да преминете към (5.2).

Като алтернатива, ако не разполагате с фураж за празната проба, подобен по вид на този от изследваната проба (виж 5.1.1), тестът за извличане може да се извърши чрез стандартен метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество диклазурил, което е близко до вече съдържащото се в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като извличането се калкулира чрез изваждане.

5.2. Екстракция

5.2.1. Фуражи

Претеглете с точност до 0,01 mg около 50 g от пробата. Прехвърлете в конична колба от 500 ml, прибавете 1,00 ml разтвор на вътрешния стандарт (3.9.2), 200 ml екстрахиращ разтворител (3.12) и запушете колбата. Поставете сместа на вибратор и я оставете така в продължение на една нощ. Оставете да се утаи за 10 минути. Прехвърлете 20 ml алиquotна част от супернатанта в подходящ стъклен съд и разреждете с 20 ml вода. Прехвърлете този разтвор в патрон за екстракция (3.11) и го прекарайте през него, като подавате вакуум (4.5). Промийте патрона с 25 ml смес от екстрахиращ разтворител (3.12) и вода, 65 + 35 (V + V). Отстранете събраните фракции и отмийте съединенията с 25 ml смес от екстрахиращ разтворител (3.12) и вода, 80 + 20 (V + V). Изпарете тази фракция до момента на достигане на сухост, като използвате ротационния изпарител (4.3) при 60 °C. Разтворете остатъка в 1,0 ml DMF (3.6), прибавете 1,5 ml вода (3.1) и разбъркайте. Филтрирайте през мембранен филтър (4.4). Преминете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.2.2. Премикси

Претеглете с точност до 0,001 mg около 1 g от пробата. Прехвърлете в конична колба от 500 ml, прибавете 1,00 ml от разтвора на вътрешния стандарт (3.9.2), 200 ml екстрахиращ разтворител (3.12) и запушете колбата. Поставете сместа на вибратор и я оставете така в продължение на една нощ. Оставете да се утаи за 10 минути. Прехвърлете 10.000/p ml алиquotна част (p=номинално съдържание на диклазурил в премикса в mg/kg) от супернатанта в колба със заоблена долна част и с подходящ размер. Изпарете под редуцирано налягане, при 60 °C, до момента на достигане на сухост, като използвате ротационния изпарител (4.3). Разтворете отново остатъка в 10,0 ml DMF (3.6), прибавете 15,0 ml вода (3.1) и разбъркайте. Филтрирайте през мембранен филтър (4.4). Преминете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.3. Определяне чрез HPLC

5.3.1. Параметри

Следните условия са дадени като указание; може да се използват други, при условие, че дават равностойни резултати:

Колона за течен хроматографски анализ (4.2.1): 100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, опаковка 3 µm или еквивалент.

31999L0027.doc – ЦПР - редактиран

Мобилна фаза: Елуиращ агент А (3.13.1): Воден разтвор на амониев ацетат и тетрабутил-амониум хидрогенсулфат

Елуиращ агент Б (3.13.2): ацетонитрил

Елуиращ агент В (3.13.3): метанол

- Режим на елуация: - линеен градиент
- първоначални условия:
 $A + B + V = 60 + 20 + 20 (v + v + v)$
- след 10 минути градиентна
елуация в продължение на 30 минути на: $A + B + V =$
 $45 + 20 + 35 (v + v + v)$

Промийте струйно с Б за 10 минути

- Скорост на пропускане: 1,5 - 2 ml/min.

- Инжекционен обем: 20 µl

- Дължина на детекция: 280 nm

Проверете стабилността на хроматографската система, като инжектирате няколко пъти калибрационен разтвор (3.10), съдържащ 2,0 µg/ml, докато се постигнат постоянни височини на пиковете и времена на задържане.

5.3.2. Калибрационен разтвор

Инжектирайте 20 µl от калибрационния разтвор (3.10) няколко пъти и определете средната височина (площ) на пика на диклазурила и пиковете на вътрешния стандарт.

5.3.3. Разтвор на пробата

Инжектирайте 20 µl от разтвора на пробата (5.2.1 или 5.2.2.) няколко пъти и определете средната височина (площ) на пика на диклазурила и пиковете на вътрешния стандарт.

6. Изчисление на резултатите

6.1. Фуражи

Съдържанието на диклазурил w (mg/kg) в пробата се представя чрез следната формула:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \beta_{d,c} \cdot 10V}{\text{-----}} \cdot \text{-----} \text{ (mg/kg) където:}$$

$$h_{i,s} \cdot h_{d,c} m$$

$h_{d,s}$ = височина (площ) на пика на диклазурила в разтвора на пробата (5.2.1)

$h_{i,s}$ = височина (площ) на пика на вътрешния стандарт в разтвора на пробата (5.2.1)

$h_{d,c}$ = височина (площ) на пика на диклазурила в калибрационния разтвор (3.10)

$h_{i,c}$ = височина (площ) на пика на вътрешния стандарт в калибрационния разтвор (3.10)

$\beta_{d,c}$ = концентрация на диклазурила в калибрационния разтвор в $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = масата в g на взетата за анализ част от пробата

V = обем на екстракта от пробата, съгласно 5.2.1 (т.е. 2,5 ml)

6.2. Премикси

Съдържанието на диклазурил w (mg/kg) в пробата се представя чрез следната формула:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \beta_{d,c} \cdot 0,02V \cdot p}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} m} \quad (\text{mg/kg}) \quad \text{където:}$$

$h_{d,c}$ = височина (площ) на пика на диклазурила в калибрационния разтвор (3.10)

$h_{i,c}$ = височина (площ) на пика на вътрешния стандарт в калибрационния разтвор (3.10)

$h_{d,s}$ = височина (площ) на пика на диклазурила в разтвора на пробата (5.2.2)

$h_{i,s}$ = височина (площ) на пика на вътрешния стандарт в разтвора на пробата (5.2.2)

$\beta_{d,c}$ = концентрация на диклазурила в калибрационния разтвор в $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = масата в g на взетата за анализ част от пробата

V = обем на екстракта от пробата, съгласно 5.2.2 (т.е. 25 ml)

p = номинално съдържание на диклазурил в mg/kg в премикса

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография, или като се използва диоден детектор, чрез който се сравняват спектрите на екстракта от пробата (5.2.1 или 5.2.2) и на калибрационния разтвор (3.10).

7.1.1. Ко-хроматография

Обогатява се екстракт от пробата (5.2.1 или 5.2.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (3.10). Количеството добавен диклазурил трябва да бъде близко до това, откритото в екстракта от пробата.

След като се вземат под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта, следва да се увеличи само височината на диклазуриловия пик. Широчината на пика, при половината от височината, трябва да бъде в границите на $\pm 10\%$ от оригиналната широчина на диклазуриловия пик или пика на вътрешния стандарт на необогатения екстракт от пробата.

7.1.2. Диодно детектиране

Резултатите се оценяват по следните критерии:

а) Дължината на вълната, при максимално абсорбиране на спектрите на пробата и спектрите на стандартите, регистрирана при максимума на пика на хроматограмата, трябва да бъде една и съща в рамките на границата, определена чрез разделителната способност на детектиращата система. При диодното детектиране, тя е обикновено в границите на $\pm 2\text{ nm}$.

б) В границите от 230 до 320 nm, регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите, не трябва да се различават за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10-100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между два спектъра при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ.

в) В границите от 230 и 320 nm, спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта от пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10-100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между спектрите при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на спектъра на максимума на пика.

Ако един от тези критерии не е спазен, наличието на анализа не е потвърдено.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени върху същата проба, не трябва да превишава:

- 30 % спрямо по-високата стойност при съдържание на диклазурил от 0,5 mg/kg до 2,5 mg/kg;
- 0,75 mg/kg при съдържание на диклазурил между 2,5 mg/kg и 5 mg/kg;
- 15 % спрямо по-високата стойност при съдържание на диклазурил над 5 mg/kg.

7.3. Извличане

При обогатена (празна) проба, извличането трябва да бъде най-малко 80 %.

8. Резултати от паралелно изследване

Проведено беше паралелно изследване, при което бяха анализирани пет проби от 11 лаборатории. Пробите се състояха от два премикса; единият смесен с органична матрица (О 100), а другият - с неорганична матрица (А 100). Теоретичното съдържание е 100 mg диклазурил за kg. Трите смесени фуража за домашни птици 31999L0027.doc – ЦПР - редактиран

бяха произведени от три различни производители (NL) (L1/Z1/K1). Теоретичното съдържание е 1 mg диклазурил за kg. Лабораториите бяха инструктирани да анализират всяка от пробите еднократно или два пъти. (По-подробна информация за това паралелно изследване може да се открие в *Journal of AOAC International*, том 77, бр. 6, 1994 г., стр .1359-1361). Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 1 А 100	Проба 2 О 100	Проба 3 L1	Проба 4 Z1	Проба 5 K1
L	11	11	11	11	6
N	19	18	19	19	12
Средно (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Номинално съдържание (mg/kg)	100	100	1	1	1
L = брой лаборатории N = брой отделни стойности S _r = стандартно отклонение на повторемостта CV _r = коефициент на изменение на повторемостта S _R = стандартно отклонение на възпроизводимостта CV _R = коефициент на изменение на възпроизводимостта					

9. Забележки

Реакцията на диклазурила трябва предварително да е показала линейност в диапазона на измерваните концентрации.

Част В

ДОЗИРАНЕ НА КАРБАДОКС

Метил 3-(2-квиноксалинилметилен)карбазат N¹, N⁴-диоксид

1. Цел и обхват

Този метод се използва за определяне на карбадокс във храните за животни, премиксите и препаратите. Границата на откриване е 1 mg/kg. Границата на определяне е 10 mg/kg.

2. Принцип

Пробата се уравновесява с вода и се екстрахира с метанол-ацетонитрил. При храните за животни, една аликвотна част от филтрирания екстракт се подлага на очистване в колона с алуминиев окис. При премиксите и препаратите, една аликвотна част от филтрирания екстракт се разрежда с вода, метанол и

ацетонитрил до получаване на подходяща концентрация. Съдържанието на карбадокс се определя чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) с обратна фаза, с помощта на UV детектор.

3. Реактиви

3.1 Метанол.

3.2 Ацетонитрил, клас HPLC

3.3 Оцетна киселина, $w = 100\%$.

3.4 Алюминиев окис: неутрален, клас на активност I.

3.5 Метанол-ацетонитрил 1 + 1 (v + v).

Смесете 500 ml метанол (3.1) с 500 ml ацетонитрил (3.2).

3.6 Оцетна киселина, $\sigma = 10\%$

Разредете 10 ml оцетна киселина (3.3) до 100 ml с вода.

3.7. Натриев ацетат, CH_3COONa

3.8. Вода, клас HPLC

3.9. Ацетатен буферен разтвор, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Разтворете 0,82 g натриев ацетат (3.7) в 700 ml вода (3.8), като с помощта на оцетна киселина (3.6) регулирайте стойността на pH до 6,0. Прехвърлете в мерителна колба от 1 000 ml, допълнете до маркировката с вода (3.8) и разбъркайте.

3.10. Мобилна фаза за HPLC

Смесете 825 ml ацетатен буферен разтвор (3.9) с 175 ml ацетонитрил (3.2). Филтрирайте през 0.22 μm филтър (4.3) и обезгазете разтвора (напр.чрез подлагане на въздействието на ултразвук в продължение на 10 минути).

3.11. Стандартна субстанция:

Чист карбадокс: Метил 3-(2-квиноксалинилметил)карбазат N^1, N^4 -диоксид, E 850

3.11.1. Основен стандартен разтвор на карбадокс, 100 $\mu\text{g/ml}$ (вж.точка 5 Процедура)

Претеглете 25 mg стандартна субстанция карбадокс (3.11) с точност до 0,1 mg в мерителна колба от 250 ml. Разтворете в метанол-ацетонитрил (3.5) чрез ултразвук (4.7). След ултразвуковата обработка, оставете разтвора да достигне стайна температура, допълнете до маркировката с метанол-ацетонитрил (3.5), и разбъркайте. Обвийте колбата с алуминиево фолио или използвайте съд от янтарно стъкло, и съхранете в хладилник. При температура $\leq 4^\circ\text{C}$, разтворът е стабилен в продължение на един месец.

3.11.2. Калибрационни разтвори

Прехвърлете съответно 2,0, 5,0, 10,0 и 20,0 ml от основния стандартен разтвор (3.11.2) в серия от 100-милилитрови калибрационни колби. Прибавете 30 ml вода, допълнете с метанол-ацетонитрил (3.5) до маркировката и разбъркайте. Тези разтвори отговарят съответно на 2,0, 5,0, 10,0 и 20,0 µg/ml карбадокс. Калибрационните разтвори трябва да бъдат пряко приготвени преди употреба.

Забележка: За определянето на карбадокс във фуражи, съдържащи по-малко от 10 mg/kg, трябва да се приготвят калибрационни разтвори с концентрация под 2,0 µg/ml.

3.12. Смес вода-(метанол-ацетонитрил) (3.5), 300 + 700 (v + v)

Смесете 300 ml вода със 700 ml смес на метанол-ацетонитрил (3.5).

4. Апаратура

4.1. Лабораторен вибратор или магнитна бъркалка.

4.2. Филтърна хартия със стъклена нишка (Whatman GF/A или еквивалент).

4.3. Стъклена колона (дължина от 300 до 400 mm, вътрешен диаметър приблизително 10 mm) с фрита от непрозрачно стъкло и източващ клапан.

Забележка: Също така може да се използва и стъклена колона с пробка или стъклена колона със скосен край; в този случай, в долния край се поставя малка тапа от стъклена вата, която се набива с помощта на стъклена пръчка.

4.4. Оборудване за HPLC с инжекционна система, подходяща за инжектиране на обеми от 20 µl .

4.4.1. Колона за течен хроматографски анализ 300 mm x 4 mm, C18, опаковка от 10 µm или еквивалент.

4.4.2. UV детектор с настройка на дължината на вълната или диоден детектор, с действие в диапазона от 225 nm до 400 nm.

4.5. Мембранен филтър, 0,22 µm .

4.6. Мембранен филтър, 0,45 µm.

4.7. Ултразвукова вана.

5. Процедура

Забележка: Карбадоксът е чувствителен на светлина. Извършвайте всички процедури при намалено осветление или използвайте стъклен съд от янтарно стъкло или обвит в алуминиево фолио.

5.1. Общо описание

31999L0027.doc – ЦПР - редактиран

5.1.1. Празна проба фураж

За изпълнението на теста за извличане (5.1.2), следва да се анализира празна проба фураж за да се провери за наличие на карбадокс и пречещи субстанции.

Фуражът от празната проба трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба, и в него не трябва да бъдат открити карбадокс или пречещи субстанции.

5.1.2. Тест за извличане

Трябва да се извърши тест за извличане, като се анализира празната проба фураж (5.1.1), обогатена чрез прибавяне на такова количество карбадокс, подобно на наличното в изследваната проба. За да обогатите при ниво 50 mg/kg, пресипете 5 ml от основния стандартен разтвор (3.11.1) в конична колба от 200 ml. Изпарете разтвора в пара от азот, докато получите приблизително 0,5 ml. Добавете 10 g празна проба фураж, разбъркайте и изчакайте 10 минути преди да преминете към екстракцията (5.2).

Като алтернатива, ако не разполагате с фураж за празната проба, подобен по вид на този от изследваната проба (виж 5.1.1), тестът за извличане може да се извърши чрез стандартен метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество карбадокс, което е близко до вече съдържащото се в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като извличането се калкулира чрез изваждане.

5.2. Екстракция

5.2.1. Фуражи

Претеглете около 10 g от изследваната проба с точност до 0,01 mg и прехвърлете в конична колба от 200 ml. Прибавете 15,0 ml вода, разбъркайте и уравновесете в продължение на 5 минути. Прибавете 35,0 ml метанол-ацетонитрил (3.5), запушете и разклащайте в продължение на 30 минути на вибратора или разбърквайте на магнитната бъркалка (4.1). Филтрирайте разтвора през филтерна хартия със стъклена нишка (4.2). Задръжте разтвора за етапа на пречистване (5.3).

5.2.2. Премикси (0,1 до 2,0 %)

Претеглете около 1 g несмляна проба с точност до 0,01 mg и прехвърлете в конична колба от 200 ml. Прибавете 15,0 ml вода, разбъркайте и уравновесете в продължение на 5 минути. Прибавете 35,0 ml метанол-ацетонитрил (3.5), запушете и разклащайте в продължение на 30 минути на вибратора или разбърквайте на магнитната бъркалка (4.1). Филтрирайте разтвора през филтерна хартия със стъклена нишка (4.2). Отмерете с пипета аликвотна част от филтрата в калибрационна колба от 50 ml. Прибавете 15,0 ml вода, допълнете до маркировката с метанол-ацетонитрил (3.5) и разбъркайте. Концентрацията на карбадокс в окончателния разтвор трябва да бъде приблизително 10 µg/ml. Филтрирайте една аликвотна част през 0,45 µm филтър (4.6). Преминете към определяне чрез HPLC (5.4).

5.2.3. Препарати (> 2 %)

Претеглете около 0,2 g несмляна проба с точност до 0,001 mg и прехвърлете в конична колба от 250 ml. Прибавете 45,0 ml вода, разбъркайте и уравновесете в продължение на 5 минути. Прибавете 105,0 ml метанол-ацетонитрил (3.5), запушете и хомогенизирайте. Поставете пробата в ултразвукова вана (4.7) за 15 минути, след което разклатете или разбъркайте в продължение на 15 минути (4.1). Филтрирайте разтвора през филтърна хартия със стъклена нишка (4.2). Разрежете аликвотна част от филтратата със смес „вода-метанол-ацетонитрил” (3.12) до получаване на окончателна концентрация на карбадокс от 10-15 µg/ml (за 10 % препарат, факторът на разреждане е 10). Филтрирайте една аликвотна част през 0,45 µm филтър (4.6). Преминете към определяне чрез HPLC (5.4).

5.3. Пречистване

5.3.1. Подготовка на колона с алуминиев окис

Претеглете 4 g алуминиев окис (3.4) и прехвърлете в стъклената колона (4.3).

5.3.2. Пречистване на пробата

Приложете 15 ml от филтрирания екстракт (5.2.1) към колоната с алуминиев окис и отстранете първите 2 ml елуат. Съберете следващите 5 ml и филтрирайте една аликвотна част през 0,45 µm филтър (4.6). Преминете към определяне чрез HPLC (5.4).

5.4. Определяне чрез HPLC

5.4.1. Параметри

Следните условия се посочват като указващи; може да се използват други, при условие, че дават равностойни резултати:

Колона за течен хроматографски анализ (4.1.1): 300 mm x 4 mm, C18, опаковка 10 µm или еквивалент.

Мобилна фаза (3.10): (3.9) и ацетонитрил (3.2), 825 + 175 (v +v).	Смес от ацетатен буферен разтвор
---	----------------------------------

Скорост на пропускане:	1,5 - 2 ml/min.
------------------------	-----------------

Дължина на детекция:	365 nm
----------------------	--------

Инжекционен обем:	20 µl
-------------------	-------

Проверете стабилността на хроматографската система, като инжектирате няколко пъти калибрационен разтвор (3.11.2), съдържащ 5,0 µg/ml, докато се постигнат постоянни пикови височини и времена на задържане.

5.4.2. Калибрираща графика

Инжектирайте всеки калибрационен разтвор (3.11.2) по няколко пъти и определете средните височини на пиковите (площите) за всяка концентрация. Начертайте калибрираща графика, като използвате средните пикови височини или площи на калибрационните разтвори за ординати, а съответстващите концентрации в $\mu\text{g/ml}$ - за абсциси.

5.4.3. Разтвор на пробата

Инжектирайте екстракта от пробата ((5.3.2) за фуражи, (5.2.2) за премикси и (5.2.3) за препарати) няколко пъти, и определете средната пикова височина (площ) на пиковите на карбадокса.

6. Изчисление на резултатите

От средната височина (площ) на пиковите на карбадокса от разтвора на пробата, като използвате калибриращата графика (5.4.2), определете концентрацията на разтвора на пробата в $\mu\text{g/ml}$.

6.1. Фуражи

Съдържанието на карбадокс w в mg/kg в пробата се изразява със следната формула:

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m} \text{ (mg/kg) където:}$$

β = концентрация на карбадокс в екстракта от пробата (5.3.2) в $\mu\text{g/ml}$

V_1 = обем на екстракция в ml (т.е. 50)

m = масата в g на взетата за анализ част

6.2. Премикси и препарати

Съдържанието на карбадокс w в mg/kg в пробата се изразява със следната формула:

$$w = \frac{\beta \times V_2 \times f}{m} \text{ (mg/kg) където:}$$

β = концентрация на карбадокс в екстракта от пробата (5.2.2 или 5.2.3) в $\mu\text{g/ml}$

V_2 = обем на екстракция в ml (т.е. 50 за премикси; 150 за препарати)

f = фактор на разреждане съгласно 5.2.2 (премикси) или 5.2.3 (препарати)

m = масата в g на взетата за анализ част

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография, или като се използва диоден детектор, чрез който се сравняват спектрите на екстракта от пробата и на калибрационния разтвор (3.11.2), съдържащ $10,0 \mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Ко-хроматография

Обогатява се екстракт от пробата, като се прибави подходящо количество калибрационен разтвор (3.11.2). Количеството добавен карбадокс трябва да бъде близко до това, открито в екстракта на пробата.

След като се вземат под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта, следва да се увеличи само височината на пика на карбадокса. Широчината на пика, при половината от височината, трябва да бъде в границите приблизително на 10 % от оригиналната широчина.

7.1.2. Диодно детектиране

Резултатите се оценяват по следните критерии:

а) Дължината на вълната при максимално абсорбиране на спектрите на пробата и спектрите на стандартите, регистрирана при максимума на пика на хроматограмата, трябва да бъде една и съща в рамките на границата, определена чрез разделителната способност на детектиращата система. При диодното детектиране, тя е обикновено в границите на ± 2 nm;

б) В границите от 225 до 400 nm, регистрираните при максимума на пика на хроматограмата спектри на пробата и на стандартите, не трябва да се различават за тези части на спектъра, попадащи в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между два спектъра при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на стандартния анализ;

в) В границите от 225 до 400 nm, спектрите на възходящата линия, максимума и низходящата линия на пика, получен от екстракта на пробата, не трябва да се различават един от друг за тези части на спектъра, които попадат в диапазона от 10 до 100 % относителна абсорбция. Този критерий е спазен, когато са налице същите максимуми и когато отклонението между спектрите при всички наблюдавани точки не превишава 15 % от абсорбцията на спектъра на максимума.

Ако един от тези критерии не е спазен, наличието на анализа не е потвърдено.

7.2. Повторяемост

При съдържание 10 mg/kg и по-високо, разликата между резултатите от две паралелни определяния, извършени върху същата проба, не трябва да превишава 15 % по отношение на по-високия резултат.

7.3. Извличане

При обогатена (празна) проба, извличането трябва да бъде най-малко 90 %.

8. Резултати от паралелно изследване

Проведено беше паралелно изследване, при което бяха анализирани шест фуража, четири премикса и три препарата от осем лаборатории. Всяка проба беше анализирана два пъти. (По-подробна информация за това паралелно изследване може да се открие в *Journal of AOAC International*, том 71, 1988 г., стр.484-490). Резултатите (с изключение на рязко отличаващите се стойности) са представени по-долу:

Таблица 1: Резултати от паралелно изследване върху фуражи

	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4	Проба 5	Проба 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Средно (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
Номинално съдържание (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Таблица 2: Резултати от паралелно изследване върху премикси и препарати

	Премикси				Препарати		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Средно (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _r (mg/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 (mg/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
Номинално съдържание (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = брой лаборатории

N = брой отделни стойности

S_r = стандартно отклонение на повторемостта

CV_r = коефициент на изменение на повторемостта

S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта

CV_R = коефициент на изменение на възпроизводимостта