

**TÓLFTA TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 93/117/EB**  
**frá 17. desember 1993**  
**um að taka upp í bandalaginu greiningaraðferðir vegna opinbers eftirlits með fóðri**

**FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA**  
**HEFUR,**

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 70/373/EBE frá 20. júlí 1970 um að taka upp í bandalaginu aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fóðri <sup>(1)</sup>, eins og henni var síðast breytt með reglugerð (EBE) nr. 3768/85 <sup>(2)</sup>, einkum 2. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

Samkvæmt tilskipun 70/373/EBE skal opinbert eftirlit með fóðri, í þeim tilgangi að ganga úr skugga um samræmi við kröfur sem reistar eru á ákvæðum laga eða stjórnarsýslufyrirmæla um gæði og samsetningu fóðurs, framkvæmt með sýnatöku og greiningaraðferðum bandalagsins.

Taka ætti upp aðferð bandalagsins við greiningu aukefnanna róbenidíns og metýlbensókvats til að athuga hvort farið sé að skilyrðum um notkun þess í dýrafóðri.

Ráðstafanir þær sem kveðið er á um í þessari tilskipun eru í samræmi við álit fastanefndar um fóður.

**SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:**

**1. gr.**

Aðildarríkin skulu krefjast þess að greina skuli innihald róbenidíns og metýlbensókvats vegna opinbers eftirlits með fóðri með aðferðinni sem lýst er í viðaukanum við þessa tilskipun.

**2. gr.**

Aðildarríkin skulu samþykka, í síðasta lagi 30. nóvember 1994, nauðsynleg lög og stjórnarsýslufyrirmæli til að fara að 1. gr og þeim ber að tilkynna framkvæmdastjórninni það þegar í stað.

Þegar aðildarríkin samþykka þessar ráðstafanir skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þær verða birtar opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

**3. gr.**

Tilskipun þessi öðlast gildi á þriðja degi frá því að hún birtist í Stjórnartíðindum Evrópubandalagsins.

Gjört í Brussel 17. desember 1993.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

*René STEICHEN*

framkvæmdastjóri.

(<sup>1</sup>) Stjttð. EB nr. L 170, 3. 8. 1970, bls. 2.

(<sup>2</sup>) Stjttð. EB nr. L 362, 31. 12. 1985, bls. 8.

## VIÐAUKI

## 1. ÁKVÖRÐUN RÓBENIDÍNS

## 1,3-bis[(4-klóróbensýlden)amínó] gúanidín-hýdróklóríð

## 1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða róbenidín í fóðri. Lægri ákvörðunarmörk eru 5 mg/kg.

## 2. Meginregla

Sýnið er dregið út með sýrðu metanóli. Útdrátturinn er þurrkaður og tiltekinn skammtur hreinsaður í áloxíðsúlu. Róbenidínið er skolað út úr súlunni með hreinu metanóli og fyllt að hæfilegu marki með ferðafasa. Róbenidíninnihald er ákvarðað með andhverfum fasa af HPLC-hreinleika (háþrýstivöskviljun) þar sem notaður er greinir fyrir útfjólubláa geisla.

## 3. Hvarfefni

## 3.1. Metanól

## 3.2. Sýrt metanól

4,0 ml af saltsýru ( $P_{20}$  c, 1,18 g/ml) eru fluttir í 500 ml mælikolbu, fyllt að marki með metanóli (3.1.) og blandað. Þessi lausn skal vera nýlöguð fyrir notkun.

## 3.3. Asetónitríl, HPLC-hreinleiki

## 3.4. Sameindasía

Tegund 3A, 8 til 12 mesh kúlur (1,6 — 2,5 mm kúlur, kristallað álsilíkat, þvermál gropa 0,3 mm)

## 3.5. Áloxíð: sýruvirknistig I fyrir súlulitskiljun

100 g af áloxíð eru flutt yfir í viðeigandi flát og 2,0 ml af vatni bætt út í. Tappi er settur á flátið og það hrist í u.þ.b. 20 mínútur. Lausnin skal geymd í vel lokuðu fláti.

3.6. Kalíumtvívetnisfosfatlausn,  $c = 0,025$  mól/l

3,40 g af kalíumtvívetnisfosfati er leyst upp í vatni (HPLC-hreinleiki) í 1000 ml mælikolbu, fyllt að marki með metanóli og blandað.

3.7. Tvínatríumvetnisfosfatlausn,  $c = 0,025$  mól/l

3,55 g af vatnsfirrtu (eða 4,45 g af tvívetni eða 8,95 g af dódekahýdrati) tví-natríumvetnisfosfati eru leyst upp í vatni (HPLC-hreinleiki) í 1000 ml mælikolbu, fyllt upp að marki og blandað.

## 3.8. HPLC-ferðafasi

Eftirfarandi hvarfefnum er blandað saman:

650 ml asetónitríl (3.3.),  
250 ml vatn (HPLC-hreinleiki),

50 ml kalíumtvívetnisfosfatlausn (3.6.),  
50 ml tvínatríumvetnisfosfatlausn (3.7.).

Lausnin er síuð í gegnum 0,22  $\mu\text{m}$  síu (4.6.) og síðan gastæmd (t.d. með úthljóði í 10 mínútur).

### 3.9. Staðall

Hreint róbenidín: 1,3-bis[(4-klóróbensýlden)amínó] gúanidín-hýdróklóríð, E 750.

#### 3.9.1. Róbenidín stofnstaðallausn: 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$

30 mg af róbenidínstaðli (3.9.) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni. Það er síðan leyst upp í súru metanóli (3.2.) í 100 ml mælikolbu, fyllt að marki með sama leysiefninu og blandað. Kolban er vafin inn í álpappír og geymd í myrkri.

#### 3.9.2. Róbenidín millistaðallausn: 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$

10,0 ml af stofnstaðallausn (3.9.1.) eru fluttir yfir í 250 ml kolbu, fyllt upp að marki með ferðafasanum (3.8.) og blandað. Kolban er vafin inn í álpappír og geymd á dimmum stað.

#### 3.9.3. Kvörðunarlausnir

Í röð 50 ml mælikolbna eru fluttir 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 og 25,0 ml af millistofnstaðallausninni (3.9.2.). Fyllt er að marki með ferðafasanum (3.8.) og blandað. Þessar lausnir eru með styrkleikann 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 og 6,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  af róbenidín hver. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar fyrir notkun.

## 4. Búnaður

### 4.1. Glersúla

Gerð úr gulbrúnu gleri með krana og u.þ.b. 150 ml geymslufláti, innra þvermál 10 til 15 mm, lengd 250 mm.

### 4.2. Hristari til nota á rannsóknarstofu

### 4.3. Hverfisvali

4.4. HPLC-búnaður með greini fyrir útfjólubláa geisla með stillanlegum bylgjulengdum eða díóðuraðar-greinir stilltur fyrir 250 til 400 mm

4.4.1. Vökvaskiljunarsúla: 300 mm x 4 mm, C<sub>18</sub>, 10  $\mu\text{m}$  umbúðir, eða sambærilegar umbúðir

4.5. Trefjaglersíupappír (Whatman GF/A eða sambærilegur pappír)

4.6. Himnusíur, 0,22  $\mu\text{m}$

4.7. Himnusíur, 0,45  $\mu\text{m}$

## 5. Vinnuaðferð

**Ath.:** Róbenidín er viðkvæmt fyrir ljósi. Nota skal gulbrúnt gler við framkvæmd allra tilrauna.

### 5.1. Almenn

- 5.1.1. Greining með núllsýni skal gerð til að ganga úr skugga um að hvorki róbenidín né truflandi efni séu fyrir hendi.
- 5.1.2. Gera skal endurheimtupróf með því að greina núllsýnið (5.1.1.) sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af róbenidíni svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Ef styrkingin á að nema 60 mg/kg skulu 3,0 ml af stofnstaðallausninni (3.9.1.) fluttir yfir í 250 ml Erlenmeyerkolbu. Lausnin er látin gufa upp við köfnunarefnisblástur að u.þ.b. 0,5 ml. 15 g af núllsýninu er bætt út í, blandað og látið bíða í 10 mínútur áður en farið er yfir í útdráttinn (5.2.).

**Ath.:** Að því er varðar þessa aðferð ætti núllsýnið að vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti róbenidín ekki að finnast.

### 5.2. Útdráttur

U.þ.b. 15 g af undirbúnu sýni eru vegin með 0,01 g nákvæmni. Það er flutt yfir í 250 ml Erlenmeyerkolbu og 100,0 ml af súru metanóli (3.2.) bætt út í, tappi settur á kolbuna og hún hrist í hristaranum (4.2.) í hálf klukkustund. Lausnin er síuð í gegnum trefjaglersúpappír (4.5.) og síuvökvanum safnað í 150 ml Erlenmeyerkolbu. 7,5 g af sameindasíum (3.4.) er bætt út í, tappi settur á kolbuna og hún hrist í fimm mínútur. Lausnin er síuð tafarlaust í gegnum trefjaglersúpappír. Þessi lausn er geymd fyrir hreinsunina (5.3.).

### 5.3. Hreinsun

#### 5.3.1. Undirbúningur áloxíðsúlunnar

Litlum glerullarhnoðra er komið fyrir við neðri enda glersúlunnar (4.1.) og hann þjappaður saman með glerstöng. 11,0 g af undirbúnu áloxíði (3.5.) eru vegin og flutt í súluna. Á þessu stigi skal vera sem minnst snerting við andrúmsloftið. Slá skal létt á neðri enda súlunnar til að áloxíðið setjist.

#### 5.3.2. Hreinsun sýnisins

5,0 ml af útdrattarsýninu sem er undirbúið samkvæmt (5.2.) eru fluttir með rennipípu í súluna. Efsti hluti rennipípunnar er látin liggja þétt við súluvegginn þannig að áloxíðið nái að drekka í sig lausnina. Róbenidínið er skolað út úr súlunni með því að nota 100 ml af metanóli (3.1.) við flæði sem er 2 til 3 ml/mín. og skolvökvanum er safnað í 250 ml kolbu með kúlulaga botni. Metanóllausnin er látin gufa upp á hverfisvalanum (4.3.) við lækkaðan þrýsting við 40 þar til allur vökvinn er horfinn. Efnaleifarnar eru leystar upp á ný í 3 til 4 ml af ferðafasanum (3.8.) og fluttar magnbundið í 10 ml mælikolbu. Kolban er skoluð með nokkrum 2 ml skömmtum af ferðafasanum og skolvökvinn fluttur í mælikolbu. Fyllt er að marki með sama leysinum og blandað. Títekinn skammtur er síaður í gegnum 0,45 µm himnusú (4.7.). Þessi lausn er geymd þar til HPLC-ákvörðun (5.4.) fer fram.

### 5.4. HPLC-ákvörðun

#### 5.4.1. Færibreytur

Eftirfarandi forsendur eru til leiðbeiningar en nota má aðrar forsendur að því tilskildu að þær gefi jafngildar niðurstöður:

Vökvaskiljun með súlu (4.4.1.),

HPLC-ferðafasi (3.8.),

Flæði: 1,5 til 2 ml/mín.,

Greiningarbylgjulengd: 317 nm,

Inndælingarrúmmál: 20 til 50 µl.

Athuga skal stöðugleika skiljunarkerfisins með því að dæla kvörðunarlausninni (3.9.3.), sem inniheldur 3,6 µg/ml inn nokkrum sinnum þar til stöðugum toppum og rástíma er náð.

#### 5.4.2. Kvörðunarferill

Dælt er með hverri kvörðunarlausn (3.9.3.) nokkrum sinnum og hæðir toppanna (svæðin) mældar fyrir hvert styrkleikastig. Kvörðunarferillinn er dreginn með meðaltopphæðum eða -svæðum kvörðunarlausnanna sem lóðhnit og samsvarandi styrkleikastigum í µg/ml sem láhnit.

#### 5.4.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.3.2.) er dælt nokkrum sinnum í sama rúmmáli og fyrir kvörðunarlausnirnar og meðaltopphæð (svæði) róbenidíntoppa er ákvörðuð.

### 6. Útreikningur niðurstaðna

Styrkur sýnislausnarinnar er ákvarðaður í mg/ml, frá meðalhæð (svæði) róbenidíntoppa sýnislausnarinnar með aðstoð kvörðunarferilsins (5.4.2.).

Innihald róbenidíns  $w$  (mg/kg) í sýninu er tilgreint með eftirfarandi formúlu:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

þar sem:

$c$  = róbenidínstyrkur sýnislausnar í µg/ml,

$m$  = massi prófunarskammts í grömmum.

### 7. Staðfesting niðurstaðna

#### 7.1. Auðkenni

Hægt er að bera kennsl á greiniefni með samhliða litskiljun, eða með því að nota díóðuraðargreini sem ber samtímis saman litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinnar (3.9.3.) sem inniheldur 6,0 µg/ml.

##### 7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdrátturinn er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.9.3.). Magn viðbættis róbenidíns á að vera svipað áætluðu róbenidínmagni í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð róbenidíntoppa að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppsins um miðbik hámarkshæðar hans skal vera innan við u.þ.b. 10% af upprunalegri breidd.

## 7.1.2. Díóðuraðargreining

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi kröfum:

- hámarksgleypniþylgju lengd litrófa sýnisins og staðalsins, sem skráð er við topppunkt á litritann, skal vera hin sama innan marka sem ákvörðuð eru með upplausnargetu greiningarkerfisins. Við díóðu-raðargreiningu er þessi stærð oftast innan við u.þ.b. 2 nm;
- á milli 250 og 400 nm má ekki vera mismunur á litrófum sýnisins og staðalsins sem skráð eru við topppunkt á litritanum, á þeim hlutum litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10 - 100%. Þessar kröfur eru uppfylltar þegar sömu hágildi eru fyrir hendi og frávikíð milli tveggja litrófa fer ekki yfir 15% af gleypni staðalgreiniefnisins á neinum athugunarpunkti;
- á milli 250 og 400 nm mega litrófin hvergi á toppi sýnisútdráttarins vera frábrugðin hvert öðru á þeim hlutum litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10 - 100%. Þessar kröfur eru uppfylltar þegar sömu hágildi eru fyrir hendi og þegar frávikíð milli litrófanna fer ekki yfir 15% af gleypni litrófs topppunktisins á öllum athugunarpunktum.

Ef einhver þessara krafna er ekki uppfyllt hefur ekki verið staðfest að greiniefnið sé fyrir hendi.

## 7.2. Endurtekningarhæfni

Mismunur niðurstaðna tveggja samhlíða ákvarðana sem gerðar eru á sama sýninu má ekki vera meiri en 10% miðað við hæstu niðurstöður fyrir róbenidíninnihald sem er yfir 15 mg/kg.

## 7.3. Endurheimtur

Að því er varðar styrkta núllprófsýnið ættu endurheimtur að vera að minnsta kosti 85%.

## 8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Bandalagið skipulagði samstarfsrannsókn þar sem fjögur sýni af alifugla- og kanínufóðri, mjöl eða pressaðar fóðurkúlur, voru greind í tólf rannsóknarstofum. Greiningarnar voru endurteknaðar á hverju sýni fyrir sig. Niðurstöðurnar er að finna í töflunni hér fyrir neðan:

	Alifuglar		Kanínur	
	Mjöl	Pressaðar fóðurkúlur	Mjöl	Pressaðar fóðurkúlur
Meðalgildi (mg/kg)	27,0	27,99	43,6	40,1
$S_R$ (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
$CV_g$ (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
$S_R$ (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
$CV_g$ (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Endurh. (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

$S_R$  = staðalfrávik endurtakanleika

$CV_g$  = fráviksstuðull endurtakanleika (%)

$S_R$  = staðalfrávik endurnýjunarleika

$CV_g$  = fráviksstuðull endurnýjunarleika (%)

## 2. ÁKVÖRÐUN METÝLBENSÓKVATS

### 7-bensýloxý-6-bútýl-3-metoxýkarbónýl-4-kínólón

#### 1. Tilgangur og umfang

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða metýlbensókvat í fóðri. Lægri ákvörðunarmörk eru 1 mg/kg.

#### 2. Meginregla

Metýlbensókvat er dregið út úr sýninu með metansúlfónsýru. Útdrátturinn er hreinsaður með díklórmetani, jónaskiptalitskiljun og síðan aftur með díklórmetani. Metýlbensókvatinnihald er ákvarðað með andhverfum fasa af HPLC-hreinleika (háþrýstivökvaskiljun) þar sem notaður er greinir fyrir útfjólubláa geisla.

#### 3. Hvarfefni

##### 3.1. Díklórmetan

##### 3.2. Metanól, HPLC-hreinleiki

##### 3.3. HPLC-ferðafasi:

blanda af metanóli (3.2.) og vatni (HPLC-hreinleiki) 75 + 25 (v + v).

Lausnin er síuð í gegnum 0,22 µm síu (4.5.) og síðan gastæmd (t.d. með úthljóði í 10 mínútur).

##### 3.4. Metansúlfónsýra, $s = 2\%$

20,0 ml af metansúlfónsýru eru þynntir með metanóli (3.2.) að 1000 ml. 3.5. Saltsýrulausn,  $s = 10\%$

100,0 ml af saltsýru ( $P_{20}c$ , 1,18 g/ml) eru þynntir með vatni að 1000 ml.

##### 3.6. Katjónaskiptiefni Amberlít CG — 120 (Na), 100 til 200 möskvar

Efnið er meðhöndluð fyrir notkun: 100 g af efninu eru hrærð saman við 500 ml af saltsýrulausn (3.5.) og hitað á hitaplötu þangað til suðumarki er náð og hrært stöðugt í. Lausnin er látin kólna og sýrunni hellt af. Lausnin er síuð í sogflösku í gegnum síupappír. Efnið er þvegið tvisvar sinnum með 500 ml af vatni og síðan með 250 ml af metanóli (3.2.). Efnið er skolað enn frekar með 250 ml af metanóli og þurrkað með því að láta loft streyma í gegn. Þurrkaða efnið er geymt í þéttri flösku.

##### 3.7. Staðall: hreint metýlbensókvat (7-bensýloxý-6-bútýl-3-metoxýkarbónýl-4-kínólón)

###### 3.7.1. Metýlbensókvatstofnstaðallausn, 500 µg/ml

50 mg af staðlinum (3.7.) eru vegin með 0,1 mg nákvæmni, leyst upp í metansúlfónsýrulausn (3.4.) í 100 ml mælikolbu, fyllt upp að marki og blandað.

###### 3.7.2. Metýlbensókvatmillistaðallausn, 50 µg/ml

5,0 ml af metýlbensókvatstofnstaðallausn (3.7.1.) eru fluttir í 50 ml kolbu, fyllt að marki með metanóli (3.2.) og blandað.

### 3.7.3. Kvörðunarlausnir

Í röð 25 ml mælikolbna eru fluttir 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml af metýlbensókvatmillistaðallaun (3.7.2.). Fyllt er að marki með ferðafasanum (3.3.) og blandað. Þessar lausnir eru með styrkleikann 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 µg/ml af metýlbensókvat hver. Þessar lausnir skulu vera nýlagðar fyrir notkun.

## 4. Búnaður

### 4.1. Hristari til nota á rannsóknarstofu

### 4.2. Hverfisvali

### 4.3. Glersúla (250 mm x 15 mm) búin krana og u.þ.b. 200 ml geymsluhláti

### 4.4. HPLC-búnaður með útfjólubláum greini með stillanlegum bylgjulengdum eða díóðuraðargreini

#### 4.4.1. Vökvaskiljunarsúla: 300 mm x 4 mm, C-18, 10 µm fylliefni eða sambærilegt fylliefni

### 4.5. Himnusíur, 0,22 µm

### 4.6. Himnusíur, 0,45 µm

## 5. Vinnuaðferð

### 5.1. Almenn

5.1.1. Greining með núllsýni skal gerð til að ganga úr skugga um að hvorki metýlbensókvat né truflandi efni séu fyrir hendi.

5.1.2. Gera skal endurheimtupróf með því að greina núllsýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við tilteknu magni af metýlbensókvati svipuðu því sem er fyrir hendi í sýninu. Ef styrkingin á að nema 15 mg/kg skal bæta 600 µl af stofnstaðallauninni (3.7.1.) við 20 g af núllsýni, blanda vel og láta bíða í 10 mínútur áður en farið er yfir í útdráttinn (5.2.).

**Ath.:** Að því er varðar þessa aðferð ætti núllsýnið að vera svipað að gerð og sýnið og við greiningu ætti metýlbensókvat ekki að finnast.

### 5.2. Útdráttur

U.þ.b. 20 g af undirbúnu sýni eru vegin með 0,01 g nákvæmni og flutt í 250 ml Erlenmeyerkolbu. 100,0 ml af metansúlfónsýrulaun (3.4.) er bætt út í og sett í hristara (4.1.) í 30 mínútur. Lausnin er síuð í gegnum pappírssíu og síuvökvinn geymdur fyrir vökvaútdráttinn (5.3.).

### 5.3. Vökva-vökva útdráttur

25,0 ml af síuvökvanum sem fengust í lið 5.2 eru fluttir í 500 ml skiltrekt sem inniheldur 100 ml af saltsýrulaun (3.5.). 100 ml af díklórmetani (3.1.) er bætt úr í skiltrektina og hrist í eina mínútu. Fasarnir eru látnir skilja sig og neðra (díklórmetan) lagið látið renna í 500 ml kolbu með kúlulaga botni. Þá er vatnsfasinn endurútdreginn með tveimur 40 ml skömmtum af díklórmetani og blandað saman við fyrsta útdráttinn í kolbu með kúlulaga botni. Díklórmetanútdráttur er eimaður í hverfisvala (4.2.) við lækkaðan þrýsting við 40 uns næstum allur vökvinn er gufaður upp. Leifarnar eru leystar upp í 20 til 25 ml af metanóli (3.2.), tappi settur í kolbuna og útdrátturinn geymdur fyrir jónaskiptalitskiljun (5.4.).



#### 5.4. Jónaskiptalitskiljun

##### 5.4.1. Undirbúningur katjónaskiptisúlu

Litlum glerullarhnoðra er komið fyrir við neðri enda glersúlunnar (4.3.). 5 g af meðhöndluðu katjónaskiptiefni (3.6.) eru hrærð saman við 50 ml af saltsýru (3.5.), blöndunni er hellt í glersúluna og látin setjast. Umfram sýru er hellt af þar til hún rétt flýtur yfir yfirborð efnisins og súlan þvegin með vatni þangað til skolvökvin sýnir engin merki á lakkmúspappír. 50 ml af metanóli (3.2.) eru settir í súluna og látnir renna niður á yfirborð efnisins.

##### 5.4.2. Litskiljun með súlu

Útdrátturinn sem fékkst í lið 5.3. er fluttur varlega í súluna með rennipípu. Kolba með kúlulaga botni er skoluð með tveimur skömmtum af 5 til 10 ml af metanóli (3.2.) og þetta skolvatn flutt í súluna. Útdrættinum er hellt niður á yfirborð efnisins og súlan þvegin með 50 ml af metanóli þannig að tryggt sé að flæðið verði ekki meira en 5 ml/mín. Metanólskolvökvanum er kastað. Metýlbensókvatið er skolað út úr súlunni með því að nota 150 ml af metansúlfónsýrulausn (3.4.) og skolvökvanum úr súlunni safnað í 250 ml Erlenmeyerkolbu.

#### 5.5. Vökva-vökvaútdráttur

Skolvökvin sem fékkst í lið 5.4.2. er fluttur í 1 lítra skiltrekt. Kolba með kúlulaga botni er skoluð með 5 til 10 ml af metanóli (3.2.) og blandað saman við innihald skiltreктarinnar. 300 ml af saltsýrulausn (3.5.) og 130 ml af díklórmetani (3.1.) er bætt út í. Lausnin er hrist í eina mínútu og fasarnir látnir skilja sig. Neðra (díklórmetan) lagið er látið renna í 500 ml mælikolbu með kúlulaga botni. Þá er vatnsfasinn endurútdreginn með tveimur 70 ml skömmtum af díklórmetani og blandað saman við fyrsta útdráttinn í kolbu með hringlaga botni.

Díklórmetanútdráttur er eimaður í hverfisvala (4.2.) við lækkaðan þrýsting við 40 uns næstum allur vökvin er gufaður upp. Leifarnar eru leystar upp í kolbu með u.þ.b. 5 ml af metanóli (3.2.) og þessi lausn flutt magnbundið í 10 ml kolbu. Kolba með kúlulaga botni er skoluð aftur með tveimur skömmtum af 1 til 2 ml af metanóli sem er síðan flutt í kolbuna. Fyllt er að marki með metanóli og blandað. Tiltekinn skammtur er síaður í gegnum himnusú (4.6.). Þessi lausn er geymd þar til HPLC-ákvörðun (5.6.) fer fram.

#### 5.6. HPLC-ákvörðun

##### 5.6.1. Færibreytur

Eftirfarandi forsendur eru til leiðbeiningar en nota má aðrar forsendur að því tilskildu að þær gefi jafngildar niðurstöður:

- vökvaskiljun með súlu (4.4.1.),
- HPLC-ferðafasi: metanól-vatnsblanda (3.3.),
- flæði: 1 til 1,5 ml/mín.,
- greiningarbylgjulengd: 265 nm,
- inndælingarrúmmál: 20 til 50 µl.

Athuga skal stöðugleika skiljunarkerfisins með því að dæla kvörðunarlausninni (3.7.3.), sem inniheldur 4 µg/ml inn nokkrum sinnum þar til stöðugum toppum (svæðum) og rástíma er náð.

### 5.6.2. Kvörðunarferill

Dælt er með hverri kvörðunarlausn (3.7.3.) nokkrum sinnum og hæðir toppanna (svæðin) mældar fyrir hvert styrkleikastig. Kvörðunarferillinn er dreginn með meðaltopphæðum eða -svæðum kvörðunarlausnanna sem lóðhnit og samsvarandi styrkleikastigum í µg/ml sem láhnit.

### 5.6.3. Sýnislausn

Sýnisútdrættinum (5.5.) er dælt nokkrum sinnum í sama rúmmáli og fyrir kvörðunarlausnirnar og meðaltopphæð (svæði) metýlbensókvattoppa er ákvörðuð.

## 6. Útreikningur niðurstaðna

Styrkur sýnislausnarinnar er ákvarðaður í mg/ml, frá meðalhæð (svæði) metýlbensókvattoppa sýnislausnarinnar með aðstoð kvörðunarferilsins (5.6.2.).

Innihald metýlbensókvats  $w$  (mg/kg) í sýninu er tilgreint með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

$c$  = metýlbensókvatstyrkur sýnislausnar í µg/ml,

$m$  = massi prófunarskamms í grömmum.

## 7. Staðfesting niðurstaðna

### 7.1. Auðkenni

Hægt er að bera kennsl á greiniefni með samhliða litskiljun, eða með því að nota díóðuraðargreini sem ber samtímis saman litróf sýnisútdráttarins og kvörðunarlausnarinnar (3.7.3.) sem inniheldur 10,0 µg/ml.

#### 7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdrátturinn er styrktur með því að bæta í hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.7.2.). Magn viðbættis metýlbensókvats á að vera svipað áætluðu metýlbensókvatmagni í sýnisútdrættinum.

Aðeins á að auka við hæð metýlbensókvattoppa að teknu tilliti til íbættis magns útdráttarins og þynningar hans. Breidd toppa um miðbik hámarkshæðar hans skal vera innan við u.þ.b. 10% af upprunalegri breidd.

#### 7.1.2. Díóðuraðargreining

Niðurstöðurnar eru metnar samkvæmt eftirfarandi kröfum:

- hámarksgleypniþylgjulengd litrófa sýnisins og staðalsins, sem skráð er við topppunkt á litritann, skal vera hin sama innan marka sem ákvörðuð eru með upplausnargetu greiningarkerfisins. Við díóðu-raðargreiningu er þessi stærð oftast innan við 2 nm;
- á milli 220 og 350 nm má ekki vera mismunur á litrófum sýnisins og staðalsins sem skráð eru við topppunkt á litritann, á þeim hlutum litrófsins þar sem hlutfallsleg gleypni er 10 - 100%. Þessar kröfur eru uppfylltar þegar sömu hágildi

eru fyrir hendi og frávikíð milli tveggja litrófa fer ekki yfir 15% af gleypni staðalgreiniefnisins á neinum athugunarpunkti;

- c) á milli 220 og 350 nm mega litrófin hvergi á toppi sýnisútdráttarins vera frábrugðin hvert öðru á þeim hlutum litrófsins sem hlutfallsleg gleypni er 10 - 100%. Þessar kröfur eru uppfylltar þegar sömu hágildi eru fyrir hendi og þegar frávikíð milli litrófanna fer ekki yfir 15% af gleypni litrófs topppunktsins á öllum athugunarpunktum.

Ef einhver þessara krafna er ekki uppfyllt hefur ekki verið staðfest að greiniefnið sé fyrir hendi.

### 7.2. Endurtekningarhæfni

Mismunur niðurstaðna tveggja samhliða ákvarðana sem gerðar eru á sama sýninu má ekki vera meiri en 10% miðað við hæstu niðurstöðu fyrir metýlbensókvatinnihald á bilinu 4 til 20 mg/kg.

### 7.3. Endurheimtur

Að því er varðar styrkta núllprófsýnið ættu endurheimtur að vera að minnsta kosti 90%.

## 8. Niðurstöður samstarfsrannsóknar

Fimm sýni voru greind í 10 rannsóknarstofum. Greiningarnar voru endurteknaðar á hverju sýni fyrir sig.

### Niðurstöður

	Núllpróf	Mjöl 1	Pr. fóðurk. 1	Mjöl 2	Pr. fóðurk. 2
Meðalgildi (mg/kg)	e.g.	4,50	4,50	8,90	8,70
S <sub>R</sub> (mg/kg)	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV <sub>g</sub> (%)	-	6,70	4,40	6,70	5,70
S <sub>R</sub> (mg/kg)	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV <sub>g</sub> (%)	-	8,90	11,10	10,10	11,50
End. (%)	-	92,00	93,00	92,00	89,00

e.g. = ekki greint

S<sub>R</sub> = staðalfrávik endurtakanleika

CV<sub>g</sub> = fráviksstuðull endurtakanleika (%)

S<sub>R</sub> = staðalfrávik endurnýjunarleika

CV<sub>g</sub> = fráviksstuðull endurnýjunarleika (%)