

**TOLVTE KOMMISJONSDIREKTIV 93/117/EØF**  
**av 17. desember 1993**  
**om fastsettelse av analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse**  
**med offentlig kontroll av fôrvarer**

**KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESKAP**  
**HAR -**

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske økonomiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 70/373/EØF av 20. juli 1970 om innføring av prøvetakings- og analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer<sup>(1)</sup>, sist endret ved forordning (EØF) nr. 3768/85<sup>(2)</sup>, særlig artikkel 2, og

ut fra følgende betraktninger:

I direktiv 70/373/EØF fastsettes det at offentlig kontroll av fôrvarer med sikte på å fastslå at krav fastsatt i henhold til lover og forskrifter om fôrvarenes kvalitet og sammensetning er overholdt, skal foretas ved hjelp av Fellesskapets prøvetakings- og analysemetoder.

For å kontrollere at vilkårene for bruk av robenidin og metylbenzokvat i fôrvarer er overholdt, bør det fastsettes en analysemetode i Fellesskapet for disse tilsetningsstoffene.

Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for fôrvarer -

**VEDTATT DETTE DIREKTIV:**

**Artikkel 1**

Medlemsstatene skal kreve at analysene fastsatt for den offentlige kontroll av fôrvarer, med hensyn til fôrvarenes innhold av robenidin og metylbenzokvat, skal utføres etter metodene beskrevet i vedlegget.

**Artikkel 2**

Medlemsstatene skal sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv, senest 30. november 1994. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal henvises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

**Artikkel 3**

Dette direktiv trer i kraft den tredje dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fellesskaps Tidende*.

Utferdiget i Brussel, 17. desember 1993.

For Kommisjonen

**René STEICHEN**

Medlem av Kommisjonen

(<sup>1</sup>) EFT nr. L 170 av 3.8.1970, s. 2.

(<sup>2</sup>) EFT nr. L 362 av 31.12.1985, s. 8.

# VEDLEGG

## BESTEMMELSE AV ROBENIDIN

### 1,3-bis[(klorbenzyliden)amino] guanidinhydroklorid

#### 1. Formål og anvendelsesområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av robenidin i fôrvarer. Nedre grense for bestemmelse er 5 mg/kg .

#### 2. Prinsipp

Prøven ekstraheres med sur metanol. Ekstraktet tørkes, og en delmengde renses på en aluminiumoksidkolonne. Robenidin elueres fra kolonnen med konsentrert metanol og økes til passende volum med mobil fase. Innholdet av robenidin bestemmes ved reversfase høytrykksvæskerkromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

#### 3. Reagenser

##### 3.1. Metanol

##### 3.2. Sur metanol

Fyll 4,0 ml saltsyre ( $\rho_{20}$  ca. 1,18 g/ml) i en 500 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.1) og bland. Løsningen bør blandes umiddelbart før bruk.

##### 3.3. Acetonitril, HPLC-kvalitet

##### 3.4. Molekylgitter

Kuler av type 3A 8-12 mesh (1,6-2,5 mm kuler, krystallinsk aluminiumsilikat, porediameter 0,3 nm).

##### 3.5. Aluminiumoksid : Sur, aktivitetsgrad I for kolonnekromatografi

Anbring 100 g aluminiumoksid i en egnet beholder og tilsett 2,0 ml vann. Sett propp i beholderen og rist ca. 20 minutter. Oppbevar væsken i en godt lukket beholder.

##### 3.6. Kaliumdihydrogenfosfatløsning, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Oppløs 3,40 g kaliumdihydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1000 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.

##### 3.7. Dinatriumhydrogenfosfatløsning

Oppløs 3,55 g vannfri (eller 4,45 g dihydrat eller 8,95 dodekahydrat) dinatriumhydrogenfosfat i vann (HPLC-kvalitet) i en 1 000 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.

##### 3.8. HPLC mobil fase

Bland følgende reagenser:

650 ml acetonitril (3.3),

250 ml vann (HPLC-kvalitet),

50 ml kaliumdihydrogenfosfatløsning (3.6),

50 ml dinatriumhydrogenfosfatløsning (3.7).

Filtrer løsningen gjennom et 0,22 mm filter (4.6) og fjern luften (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

### 3.9. Standardstoff

Ren robenidin : 1,3-bis[(4-klorbenzyliden)amino] guanidinhydroklorid E 750

3.9.1. Robenidinstamløsning : 300 mg/ml

Vei opp 30 mg robenidin standardstoff med en nøyaktighet på 0,1 mg (3.9). Oppløs stoffet i sur metanol (3.2) i en 100 ml målekolbe, fyll opp til merket med samme løsning og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar den mørkt.

3.9.2. Robenidinstandardløsning : 12 mg/ml

Overfør 10,0 ml av stamløsningen (3.9.1.) til en 250 ml målekolbe, fyll opp til merket med mobil fase (3.8) og bland. Pakk kolben inn i aluminiumsfolie og oppbevar den mørkt.

3.9.3. Kalibreringsløsninger

Overfør henholdsvis 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 og 25,0 ml av standardløsningen (3.9.2.) til en rekke 50 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.8) og bland. Disse løsningene har konsentrasjoner av robenidin på henholdsvis 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 og 6,0 mg/ml. Disse løsningene skal blandes umiddelbart før bruk.

## 4. Apparat

4.1. *Glasskolonne*

Laget av brunt glass, utstyrt med stoppekran og med et innhold på ca. 150 ml, innvendig diameter 10-15 mm, lengde 250 mm.

4.2. *Manuelt risteparat for laboratorier*

4.3. *Rotasjonsfordamper*

4.4. *HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølglengde eller diodearraydetektor som virker innenfor området 250-400 nm*

4.4.1. Væskekromatografikolonne, 300 mm x 4 mm, C18, 10 mm pakning, eller en tilsvarende kolonne

4.5. *Glassfiberfiltre (Whatman GF/A eller tilsvarende)*

4.6. *Membranfiltre, 0,22 mm*

4.7. *Membranfiltre, 0,45 mm*

## 5. Framgangsmåte

**Merknad:** Robenidin er lysfølsomt. Det bør brukes brunt glass ved alle operasjoner.

### 5.1. Generelt

- 5.1.1. En blindprøve bør analyseres for å kontrollere at det verken er robenidin eller forstyrrende stoffer tilstede.
- 5.1.2. En gjenvinningsprøve bør utføres ved å analysere blindprøven (5.1.1) som er anriket ved tilsetning av en mengde robenidin som tilsvarer mengden som finnes i prøven. For å anrike til et nivå på 60 mg/kg, overføres 3,0 ml av stamløsningen (3.9.1) til en 250 ml erlenmeyerkolbe. La løsningen dampe inn til ca. 0,5 ml i en strøm av nitrogen. Tilsett 15 g av blindprøven, bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.

**Merknad:** Til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som prøven og ved analyse bør robenidin ikke påvises i blindprøven.

### 5.2. Ekstraksjon

Vei opp ca. 15 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g. Overfør dette til en 250 ml erlenmeyerkolbe, tilsett 100,0 ml sur metanol (3.2), sett propp i kolben og rist i en time på risteapparatet (4.2). Filtrer løsningen gjennom et glassfiberfilter (4.5) og samle opp filtratet i 150 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 7,5 g molekylgitter (3.4), sett propp i kolben og rist i fem minutter. Filtrer umiddelbart løsningen gjennom et glassfiberfilter. Oppbevar denne løsningen til rensingen (5.3).

### 5.3. Rensing

#### 5.3.1. Tilberedning av aluminiumoksidkolonnen

Sett en liten glassullpropp i den nederste enden av en glasskolonne (4.1) og dytt den helt ned med en glass-stang. Vei opp og overfør 11,0 g av det tilberedte aluminiumoksidet (3.5), til kolonnen. Eksponering for luft må minskes under denne operasjonen. Bank lett på kolonnens nederste ende for å få aluminiumoksidet til å sette seg.

#### 5.3.2. Rensing av prøven

Overfør 5,0 ml av det tilberedte prøveekstraktet (5.2) med pipette til kolonnen. Hold spissen av pipetten nær kolonneveggen og la løsningen absorberes av aluminiumoksidet. Eluer robenidin fra kolonnen med 100 ml metanol (3.1) med en gjennomstrømningshastighet på 2-3 ml/minutt, og samle opp eluatet i en 250 ml rundbunnet kolbe. La metanolløsningen fordampe til tørrhet under nedsatt trykk ved 40° C ved hjelp av en rotasjonsfordamper (4.3). Oppløs resten i 3-4 ml mobil fase (3.8) og overfør den kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Skyll kolben gjentatte ganger med 1-2 ml mobil fase, som så overføres til målekolben. Fyll opp til merket med samme løsemiddel og bland. Filtrer en delmengde gjennom et 0,45 mm filter (4.7). Denne løsningen forbeholdes HPLC-bestemmelsen (5.4).

### 5.4. HPLC-bestemmelse

#### 5.4.1. Parametre

Følgende vilkår er veiledende. Andre parametre kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.8)

Gjennomstrømningshastighet: 1,5 til 2 ml/minutt

Detektorbølgelengde: 317 nm

Injeksjonsvolum: 20 til 50 ml.

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.9.3) som inneholder 3,6 mg/ml flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

#### 5.4.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.9.3) flere ganger og mål topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i mg/ml som abscisser.

#### 5.4.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstraktet (5.3.2) flere ganger, ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av robenidintoppene.

### 6. Beregning av resultater

Bestem konsentrasjonen av prøveløsningen i mg/ml ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens robenidintopper med henvisning til kalibreringskurven (5.4.2).

Innholdet av robenidin  $w$  (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

-  $c$  = robenidinkonsentrasjon i prøveløsningen i mg/ml ,

-  $m$  = prøvemengdens masse i gram.

### 7. Vurdering av resultatene

#### 7.1. Identitet

Identiteten til stoffet kan bekreftes ved kromatografi med tilsatt av kjent mengde standard, eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.9.3) som inneholder 6,0 mg/ml robenidin.

##### 7.1.1. Kromatografi med tilsatt av kjent mengde standard

Et prøveekstrakt anrikes ved tilsetning av en passende mengde kalibreringsløsning (3.9.3). Mengden tilsatt robenidin bør være lik den beregnede mengden robenidin som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av robenidintoppen bør øke samtidig som det tas hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor  $\pm 10\%$  av den opprinnelige bredden.

## 7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningssevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor  $\pm 2$  nm,
- mellom 250 og 400 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er tilstede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overstiger 15 % av standardstoffets absorpsjon,
- mellom 250 og 400 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er tilstede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overstiger 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av stoffet ikke bekreftet.

## 7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene for to parallellbestemmelser som er utført på den samme prøven må ikke overstige 10 % for robenidininnhold opp til 15 mg/kg.

## 7.3. Gjenvinning

For den anrikede blindprøven bør gjenvinningen være minst 85 %.

## 8. Resultater av en fellesanalyse

Innenfor rammen av en fellesanalyse i Fællesskapet ble fire prøver av fjørfe- og kaninfôr i form av mel eller pelleter analysert av tolv laboratorier. Det ble foretatt en dobbeltanalyse av hver prøve. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Fjørfe		Kanin	
	Mel	Pelleter	Mel	Pelleter
Gjennomsnitt (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
Gjenvinning (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

$S_R$  = standardavvik for repeterbarhet

$CV_g$  = variasjonskoeffisient for repeterbarhet (%)

$S_R$  = standardavvik for reproduserbarhet

$CV_g$  = variasjonskoeffisient for reproduserbarhet (%)

## 2. BESTEMMELSE AV METYLBENZOKVAT

### 7-benzyloksi-6-butyl-3-metoksykarbonyl-4-kinolon

#### 1. Formål og anvendelsesområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme innholdet av metylbenzokvat i fôrvarer. Nedre grense for bestemmelse er 1 mg/kg .

#### 2. Prinsipp

Metylbenzokvat ekstraheres fra prøven med en løsning av metansulfonsyre i metanol. Ekstraktet renses med diklormetan, ved ionebytterkromatografi og deretter igjen med diklormetan. Innholdet av metylbenzokvat bestemmes ved reversfase høytrykksvæskekromatografi (HPLC) ved bruk av en UV-detektor.

#### 3. Reagenser

##### 3.1. Diklormetan

##### 3.2. Metanol, HPLC-kvalitet.

##### 3.3. HPLC mobil fase

Blanding av metanol (3.2) og vann (HPLC-kvalitet) 75 + 25 (V + V).

Filtrer løsningen gjennom et 0,22 mm filter (4.5) og fjern luften (f.eks. ved ultralydbehandling i 10 minutter).

##### 3.4. Metansulfonsyreløsning, $s = 2\%$

Oppløs 20,0 ml metansulfonsyre i metanol (3.2) til 1000 ml.

##### 3.5. Saltsyreløsning, $s = 10\%$

Oppløs 100 ml saltsyre ( $x_{20}$  ca. 1,18 g/ml) i vann til 1000 ml.

##### 3.6. Kationebytterharpiks Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

Harpiksen behandles før bruk: bland 100 g harpiks med 500 ml saltsyreløsning (3.5) og varm opp til kokepunktet på en kokeplate under stadig omrøring. La blandingen kjøle, og bunnfell syren. Filtrer deretter harpiksen gjennom filterpapir under vakuüm. Vask harpiksen to ganger med vann i mengder på 500 ml, og deretter med 250 ml metanol (3.2). Skyll harpiksen med ytterligere 250 ml metanol, og tørk ved å sende en luftstrøm gjennom filterkaken. Oppbevar den tørkede harpiksen i en flaske med propp.

##### 3.7. Standardstoff : ren metylbenzokvat (7-benzyloksi-6-butyl-3-metoksykarbonyl-4-kinolon)

###### 3.7.1. Metylbenzokvatstamløsning, 500 mg/ml

Vei opp 50 mg standardstoff (3.7) med en nøyaktighet på 0,1 mg, oppløs stoffet i metansulfonsyreløsning (3.4) i en 100 ml målekolbe, fyll opp til merket og bland.

###### 3.7.2. Metylbenzokvatstandardløsning : 50 mg/ml

Overfør 5,0 ml av stamløsningen (3.7.1.) til en 50 ml målekolbe, fyll opp til merket med metanol (3.2) og bland.

### 3.7.3. Kalibreringsløsninger

Overfør henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 5,0 ml av standardløsningen (3.7.2.) til en rekke 25 ml målekolber. Fyll opp til merket med mobil fase (3.3) og bland. Disse løsningene har konsentrasjoner av metylbenzokvat på henholdsvis 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 og 10,0 mg/ml. Disse løsningene skal blandes umiddelbart før bruk.

## 4. Apparat

4.1. Risteapparat.

4.2. Rotasjonsfordamper

4.3. Glasskolonne (250 mm x 15 mm) utstyrt med stoppekran og med innhold på ca. 200 ml

4.4. HPLC-utstyr med UV-detektor med variabel bølgelengde eller diodearraydetektor

4.4.1. Væskekromatografikolonne, 300 mm x 4 mm, C18, 10 mm pakning, eller en tilsvarende kolonne

4.5. Membranfiltrer, 0,22 µm

4.6. Membranfiltrer, 0,45 µm

## 5. Framgangsmåte

5.1. Generelt

5.1.1. En blindprøve bør analyseres for å kontrollere at det verken er metylbenzokvat eller forstyrrende stoffer tilstede.

5.1.2. En gjenvinningsprøve bør utføres ved å analysere blindprøven som er anriket ved tilsetning av en mengde metylbenzokvat som tilsvarer mengden som finnes i prøven. For å anrike til et nivå på 15 mg/kg, tilsettes 600 ml av stamløsningen (3.7.1) til en 20 g blindprøve, bland og vent i 10 minutter før ekstraksjonen (5.2) innledes.

**Merknad:** Til denne metoden bør blindprøven være av tilsvarende type som prøven og ved analyse bør metylbenzokvat ikke påvises i blindprøven.

5.2. Ekstraksjon

Vei opp 20 g av den tilberedte prøven med en nøyaktighet på 0,01 g i en 250 ml erlenmeyerkolbe. Tilsett 100,0 ml metanolsulfonsyreløsning (3.4) og rist i 30 minutter på risteapparatet. Filtrer løsningen gjennom et filterpapir og oppbevar filtratet til faseskillingen (5.3).

5.3. Væske-væske-fordeling

Overfør 25,0 ml av filtratet (5.2) til en 500 ml skilletrakt som inneholder 100 ml saltsyreløsning (3.5). Tilsett 100 ml diklormetan (3.1) til trakten, og rist i ett minutt. Etter at de to fasene har skilt seg tappes den nederste fasen (diklormetan) i en 500 ml rundbunnet kolbe. Gjenta ekstraksjonen av den vandige fasen med ytterligere to mengder diklormetan på 40 ml, og bland disse med det første ekstraktet i den rundbunnede kolben. Damp inn diklormetane-kstraktet til tørrhet på rotasjonsfordamperen (4.2) ved 40° C under redusert trykk. Oppløs resten i 20-25 ml metanol (3.2), sett propp i kolben, og oppbevar hele ekstraktet til ionebytterkromatografi (5.4).



#### 5.4. Ionebytterkromatografi

##### 5.4.1 Tilberedning av kationebytterkolonnen

Sett en glassullpropp i den nederste enden av en glasskolonne (4.3) Tilbered en oppslemming av 5,0 g av den behandlede kationebytterharpiksen (3.6) og 50 ml saltsyre (3.5), overfør blandingen til glasskolonnen, og gi den tid til å sette seg. La syren synke til den står like over harpiksoverflaten og vask kolonnen med vann til vaskevannet er nøytralt overfor lakmuspapir. Overfør 50 ml metanol (3.2) til kolonnen og la den synke ned til harpiksoverflaten.

##### 5.4.2. Kolonnekromatografi

Overfør 5,0 ml av det tilberedte ekstraktet (5.3) forsiktig med pipette til kolonnen. Skyll den rundbunnede kolben med to mengder på 5-10 ml metanol (3.2), og overfør skyllevæsken til kolonnen. La ekstraktet synke til harpiksoverflaten og vask kolonnen med 50 ml metanol mens det sørges for at gjennomstrømningshastigheten ikke overstiger 5 ml per minutt. Fjern den eluerte metanolen. Eluer metylbenzokvat fra kolonnen ved bruk av 150 ml metansulfonsyreløsning (3.4) og samle opp eluatet fra kolonnen i en 250 ml erlenmeyerkolbe.

#### 5.5. Væske-væske-fordeling

Overfør eluatet fra operasjonen i (5.4.2) til en skilletrakt på 1 liter. Skyll erlenmeyerkolben med 5-10 ml metanol (3.2), og bland skyllevæsken med innholdet i skilletrakten. Tilsett 300 ml saltsyreløsning (3.5) og 130 ml diklormetan (3.1). Rist i ett minutt og la de to fasene skilles. Tapp den nederste fasen (diklormetan) i en 500 ml rundbunnet kolbe. Gjenta ekstraksjonen av den vandige fasen med ytterligere to mengder diklormetan, hver på 70 ml, og bland disse ekstraktene med det første i den rundbunnede kolben.

Damp inn diklormetanekestret til tørrhet på rotasjonsfordamperen (4.2) ved 40° C under redusert trykk. Oppløs resten med ca. 50 ml metanol (3.2), og overfør løsningen kvantitativt til en 10 ml målekolbe. Skyll den rundbunnede kolben med ytterligere to mengder på 1-2 ml metanol og overfør væsken til målekolben. Fyll opp til merket med metanol og bland. Filtrer en delmengde gjennom et membranfilter (4.6). Oppbevar denne løsningen til HPLC-bestemmelsen (5.6).

#### 5.6. HPLC-bestemmelse

##### 5.6.1. Parametre

Følgende vilkår er veiledende. Andre parametre kan brukes forutsatt at de gir de samme resultater.

HPLC-kolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase : blanding av metanol og vann (3.3)

Gjennomstrømningshastighet: 1 til 1,5 ml/minutt

Detektorbølglengde: 265 nm

Injeksjonsvolum: 20 til 50 ml.

Kontroller stabiliteten til det kromatografiske systemet ved å injisere kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 4 mg/ml flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder og retensjonstider.

### 5.6.2. Kalibreringskurve

Injiser hver kalibreringsløsning (3.7.3) flere ganger og mål topphøydene (-arealene) for hver konsentrasjon. Trekk opp en kalibreringskurve ved bruk av de gjennomsnittlige topphøydene eller -arealene for kalibreringsløsningene som ordinator og de tilsvarende konsentrasjonene i mg/ml som abscisser.

### 5.6.3. Prøveløsning

Injiser prøveekstratet (5.5) flere ganger, ved bruk av samme mengde som for kalibreringsløsningene og bestem den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av metylbenzokvattoppene.

## 6. Beregning av resultater

Bestem konsentrasjonen av prøveløsningen i mg/ml ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) av prøveløsningens metylbenzokvattopper med henvisning til kalibreringskurven (5.6.2).

Innholdet av metylbenzokvat  $w$  (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

- $c$  = metylbenzokvatkonsentrasjon i prøveløsningen i mg/ml ,
- $m$  = prøvemengdens masse i gram.

## 7. Vurdering av resultatene

### 7.1. Identitet

Identiteten til stoffet kan bekreftes ved kromatografi med tilsats av kjent mengde standard, eller ved bruk av en diodearraydetektor som gjør det mulig å sammenligne spektrene til prøveekstraktet og kalibreringsløsningen (3.7.3) som inneholder 10 mg/ml metylbenzokvat.

#### 7.1.1. Kromatografi med tilsats av kjent mengde standard

Et prøveekstrakt anrikes ved tilsetning av en passende mengde standardløsning (3.7.2). Mengden tilsatt metylbenzokvat bør være lik den beregnede mengden metylbenzokvat som er funnet i prøveekstraktet.

Bare høyden av metylbenzokvattoppen bør øke samtidig som det tas hensyn til både den tilsatte mengden og fortynningen av ekstraktet. Toppbredden skal ved den halve høyden være innenfor  $\pm 10\%$  av den opprinnelige bredden.

#### 7.1.2. Diodearraydeteksjon

Resultatene vurderes etter følgende kriterier:

- a) bølgelengden for maksimal absorpsjon for prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, må være den samme innenfor en margin beregnet ut fra detektorsystemets oppløsningsevne. For diodearraydeteksjon er den vanligvis innenfor  $\pm 2$  nm,
- b) mellom 220 og 350 nm må prøven og standardens spektre, målt ved toppens spiss på kromatogrammet, ikke være forskjellige med hensyn til de delene av spekteret

som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er tilstede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overstiger 15 % av standardstoffets absorpsjon,

- c) mellom 220 og 350 nm må spektrene til den voksende kurven, spissen og den avtagende kurven til prøveekstraktets topp ikke være forskjellige fra hverandre med hensyn til de delene av spekteret som ligger mellom 10 og 100 % av den relative absorpsjonen. Dette kriteriet er oppfylt når de samme maksima er tilstede og avviket mellom spektrene ikke på noe observert punkt overstiger 15 % av spekterets absorpsjon i spissen.

Dersom ett av disse kriteriene ikke er oppfylt, er forekomsten av stoffet ikke bekreftet.

### 7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene for to parallellbestemmelser som er utført på den samme prøven må ikke overstige 10 % for metylbenzokvatinnhold mellom 4 og 20 mg/kg.

### 7.3. Gjenvinning

For den anrikede blindprøven bør gjenvinningen være minst 90 %.

## 8. Resultater av en fellesanalyse

I en fellesanalyse ble fem prøver analysert av ti laboratorier. Det ble foretatt en dobbeltanalyse av hver prøve.

	Blind	Mel 1	Pelleter 1	Mel 2	Pelleter 2
Gjennomsnitt (mg/kg)	i.p.	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
Gjenvinning (%)	-	92,00	93,00	92,00	89,00

**i.p.** = ikke påvist

**S<sub>R</sub>** = standardavvik for reproduserbarhet

**CV<sub>g</sub>** = variasjonskoeffisient (%)

**S<sub>R</sub>** = standardavvik for reproduserbarhet

**CV<sub>g</sub>** = variasjonskoeffisient (%)