31993L0070

1993 9 17 *EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS* L 234/17

VIENUOLIKTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA 93/70/EEB

1993 m. liepos 28 d.

nustatanti Bendrijos analizės metodus oficialiai pašarų kontrolei vykdyti

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos Ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų valstybinei pašarų kontrolei, įvedimo ([1]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EEB) Nr. 3768/85 ([2]), būtent jo 2 straipsniu,

kadangi Direktyvoje 70/373/EEB reikalaujama, kad tikrinant, ar pašarai atitinka įstatymų, reglamentų arba administracinių aktų nuostatų jiems keliamus reikalavimus dėl kokybės ir sudėties, oficiali pašarų kontrolė būtų vykdoma naudojant Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodus;

kadangi Bendrijoje reikia nustatyti pašarų priedo halofuginono analizės metodą, kuris būtų naudojamas tikrinant, ar laikomasi nustatytų šio priedo naudojimo gyvuliams šerti sąlygų;

kadangi šioje direktyvoje numatytos priemonės sutampa su nuolatinio Pašarų komiteto nuomone,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad analizė vykdant oficialią pašarų kontrolę halofuginono kiekiui nustatyti būtų atliekama pagal šios direktyvos priede aprašytą metodą.

2 straipsnis

Ne vėliau kaip iki 1994 m. birželio 30 d. valstybės narės priima visus šiai direktyvai įgyvendinti reikalingus įstatymus, reglamentus bei administracines nuostatas ir apie tai nedelsdamos informuoja Komisiją.

Kai valstybės narės priima šias įstatymų nuostatas, jose turi būti nuoroda į šią direktyvą arba tokia nuoroda pateikiama šias nuostatas oficialiai skelbiant. Tokių nuorodų pateikimo tvarką nustato valstybės narės.

3 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1993 m. liepos 28 d.

Komisijos vardu

René STEICHEN

Komisijos narys

([1]) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
([2]) OL L 362, 1985 12 31, p. 8.

PRIEDAS

HALOFUGINONO NUSTATYMAS

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H) vandenilio bromidas

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šis metodas naudojamas halofuginonui nustatyti pašaruose. Nustatymo riba yra 1 mg/kg.

2. **Metodo esmė**

Paveikus karštu vandeniu, halofuginonas ekstrahuojamas kaip laisva bazė į etilo acetą ir po to išskiriamas kaip vandenilio chloridas į vandeninį rūgšties tirpalą. Ekstraktas išgryninamas, naudojant jonų mainų chromatografiją. Halofuginono kiekis nustatomas atvirkštinės fazės efektyviąja skysčių chromatografija (ESCh), naudojant UV detektorių.

3. **Reagentai**

3.1. Acetonitrilas, chromatografiškai grynas

3.2. Amberlito XAD-2 derva

3.3. Amonio acetatas

3.4. Etilo acetatas

3.5. Ledinė acto rūgštis

3.6. Halofuginono standartinė medžiaga (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-vandeniliobromidas, E 764)

3.6.1. Halofuginono pradinis standartinis tirpalas, 100 µg/ml

Į 500 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg halofuginono (3.6), ištirpdoma amonio acetato buferiniame tirpale (3.18), iki žymės skiedžiama buferiniu tirpalu ir išmaišoma. Laikant tamsoje, šis tirpalas išlieka pastovus tris savaites, temperatūrai esant 5 °C.

3.6.2. Kalibraciniai tirpalai

Į 100 ml talpos matavimo kolbas atitinkamai įpilama 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.6.1). Iki žymės pripilama judančios fazės (3.21) ir išmaišoma. Šiuose tirpaluose halofuginono koncentracija atitinkamai yra 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti paruošiami prieš pat vartojimą.

3.7. Chloro vandenilio rūgštis (ρ_{20}maždaug 1,16 g/ml)

3.8. Metanolis

3.9. Sidabro nitratas

3.10. Natrio askorbatas

3.11. Natrio karbonatas

3.12. Natrio chloridas

3.13. EDTA (etilendiaminotetraacto rūgšties, dinatrio druska)

3.14. Vanduo, chromatografiškai grynas

3.15. Natrio karbonato tirpalas, c = 10g/100ml

3.16. Natrio chloridu prisotinto natrio karbonato tirpalas, c = 5g/100ml

Vandenyje ištirpdoma 50 g natrio karbonato (3.11), atskieskite iki 1 l ir pridėkite natrio chlorido (3.12), kol tirpalas taps prisotintas.

3.17. Chloro vandenilio rūgštis, maždaug 0,1 mol/l

Vandeniu atskiedžiama 10 ml HCl (3.7) iki 1 l.

3.18. Amonio acetato buferinis tirpalas, maždaug 0,25

Vandenyje (3.14) ištirpdoma 19,3 g amonio acetato (3.3) ir 30 ml acto rūgšties (3.5) ir atskieskite iki 1 l.

3.19. Amberlito XAD-2 dervos paruošimas

Vandeniu perplaunama reikiamas kiekis amberlito (3.2), kol pašalinami visi chlorido jonai, ką rodo sidabro (3.20) nitrato testas, atliktas su išpiltąja vandens faze. Tada derva perplaunama 50 ml metanolio (3.8), metanolis išpilamas ir derva laikoma užpilta šviežiu metanoliu.

3.20. Sidabro nitrato tirpalas, maždaug 0,1 mol/l

0,17 g sidabro nitrato (3.9) ištirpdoma 10 ml vandens.

3.21. **ESCh judančioji fazė**

500 ml acetonitrilo (3.1) sumaišoma su 300 ml amonio acetato buferiniu tirpalu (3.18) ir 1 200 ml vandens (3.14). Naudojant acto rūgštį, sureguliuojama pH iki 4,3. Perfiltruojama per 0,22 µm filtrą (4.8) ir degazuojama (pvz., 10 min. naudodami ultragarsą). Laikomas tamsoje uždarytoje talpykloje šis tirpalas išlieka pastovus vieną mėnesį.

4. **Įranga**

4.1. Ultragarso vonia

4.2. Sukamasis garintuvas

4.3. Centrifuga

4.4. ESCh įrenginys su kintamo bangos ilgio UV arba diodinės matricos detektoriumi

4.4.1. Skysčių chromatografinė kolonėlė, 300 mm x 4 mm, C 18, 10 µm įkrova, arba panaši kolonėlė

4.5. Stiklinė kolonėlė (300 mm x 10 mm) su sukepinto stiklo filtru ir uždaromuoju čiaupu

4.6. Stiklo pluošto filtrai, 150 mm skersmens

4.7. Membraniniai filtrai, 0,45 µm

4.8. Membraniniai filtrai, 0,22 µm

5. **Darbo procedūra**

Pastaba: halofuginonas kaip laisva bazė *nėra patvarus šarminiuose ir etilo acetato tirpaluose, todėl negali būti etilo acetate ilgiau kaip 30 minučių.*

5.1. **Bendrosios nuostatos**

5.1.1. Atliekama „tuščiojo pašaro“ analizė, kad įsitikintumėme, jog nėra nei halofuginono, nei trukdančiųjų medžiagų.

5.1.2. Turi būti atliekamas išgavos testas su „tuščiuoju pašaru“, pridedant maždaug tokį halofuginono kiekį, koks yra mėginyje. Siekiant gauti koncentraciją 3 mg/kg, reikia į 10 g pašaro be priedų įpilti 300 µl pradinio standartinio tirpalo (3.6.1), išmaišyti ir prieš ekstrahuojant (5.2) palaukti 10 minučių.

Pastaba: naudojant *šį metodą, „tuščiasis pašaras“ turi būti panašios rūšies kaip mėginys, o analizės metu halofuginono neturi būti rasta.*

5.2. **Ekstrahavimas**

200 ml talpos centrifugos mėgintuvėlyje 0,1 g tikslumu pasveriama 10 g paruošto mėginio, įdedama 0,5 g natrio askorbato (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) ir 20 ml vandens ir išmaišoma. Mėgintuvėlis įdedamas 5 minutėms į vandens vonią (80 °C). Atvėsinamas iki kambario temperatūros, įpilama 20 ml natrio karbonato tirpalo (3.15) ir išmaišoma. Tuoj pat įpilama 100 ml etilo acetato (3.4) ir 15 sekundžių stipriai purtoma rankose. Atlaisvinus kamštį trims minutėms mėgintuvėlis įdedamas į ultragarso vonią (4.1). Centrifuguojama 2 minutes ir etilacetato fazė per stiklo pluošto filtrą nupilama į 500 ml dalomąjį piltuvą. Pakartojamas mėginio ekstrahavimas su antrąją 100 ml etilo acetato porcija. Vieną minutę plaunama sujungtus ekstraktus 50 ml natrio karbonato tirpalu prisotintu natrio chloridu (3.16) ir atmetamas vandeninio sluoksnis.

Organinis sluoksnis ekstrahuojamas 1 minutę 50 ml chloro vandenilio rūgšties (3.17). Išleidžiamas apatinis rūgšties sluoksnis į 250 ml dalomąjį piltuvą. Organinis sluoksnis dar kartą ekstrahuojamas 1,5 min. su kita 50 ml chloro vandenilio rūgšties porcija ir gautas ekstraktas sujungiamas su pirmuoju ekstraktu. Abu sujungti rūgšties ekstraktai plaunami maždaug 10 sekundžių sukant juos su 10 ml etilo acetato (3.4).

Kokybiškai perpilamas visas vandeninis sluoksnis į 250 ml talpos apvaliadugnę kolbą, o organinė fazė išpilama. Rotaciniame garintuve (2.4), iš rūgšties tirpalo išgarinamas visas likęs etilo acetatas. Vandens vonios temperatūra neturi būti didesnė kaip 40 °C. Maždaug 25 milibarų vakuume visas likęs etilo acetatas turėtų būti pašalinamas per 5 minutes, kai temperatūra 38 °C.

5.3. **Valymas**

5.3.1. Amberlito kolonėlės paruošimas

Kiekvienam mėginio ekstraktui paruošiama XAD-2 kolonėlė. 10 g paruošto amberlito (3.19) perpilama į stiklinę kolonėlę (4.5) su metanoliu (3.8). Ant dervos sluoksnio uždedamas nedidelis stiklo vatos kamštelis. Metanolis pašalinamas iš kolonėlės ir derva nuplaunama 100 ml vandens, sustabdant tėkmę, kai skystis pasiekia dervos paviršių. Prieš naudojant, 10 minučių kolonėlei leidžiama atstatyti pusiausvyrą. Neleidžiama, kad kolonėlė išdžiūtų.

5.3.2. Mėginio išvalymas

Kiekybiškai perpilamas visas ekstrakto kiekis (5.2) ant paruoštos amberlito kolonėlės paviršiaus (5.3.1) ir eliuojama, išmetant eliuatą. Eliuavimo greitis neturėtų viršyti 20 ml/min. Apvaliadugnė kolba išskalaujama su 20 ml chloro vandenilio rūgšties (3.17) ir panaudojama tai dervos kolonėlei išplauti. Likęs rūgšties tirpalas sustumiamas oro srautu. Išplova išpilama. Įpilama 100 ml metanolio (3.8) į kolonėlę ir leidžiama eliuotis nuo 5 iki 10 ml, surenkant eliuatą į 250 ml apvaliadugnę kolbą. Likęs metanolis paliekamas 10 min. atstatyti pusiausvyrą su derva ir eliuavimas tęsiamas greičiu, neviršijančiu 20 ml/min, surenkant eliuatą toje pačioje kolboje. Metanolis išgarinamas rotaciniame garintuve (4.2). Vandens vonios temperatūra neturi būti didesnė kaip 40 °C. Panaudojant judančiąją fazę (3.21), liekana kiekybiškai perpilama į 10 ml kalibruotą kolbą. Judančioji fazė skiedžiama iki žymės ir išmaišoma. Alikvota filtruojama per membraninį filtrą (4.7). Šis tirpalas naudojamas ESCh matavimui (5.4).

5.4. **ESCh matavimas**

5.4.1. Parametrai

Siūloma taikyti šias arba kitas sąlygas, jei jos duoda panašius rezultatus:

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1)

ESCh judančioji fazė (3.21)

Debitas: nuo 1,5 iki 2 ml/min

Matavimo bangos ilgis: 243 nm

Įleidžiamas tūris: nuo 40 iki 100 µl

Patikrinamas chromatografinės sistemos stabilumas, kelis kartus įleidžiama kalibracinio tirpalo (3.6.2) 3,0 µg/ml, kol smailės aukštis ir sulaikymo trukmė nesikeis.

5.4.2. Kalibracinė kreivė

Kiekvienas kalibracinis tirpalas (3.6.2) įleidžiamas kelis kartus ir išmatuojama kiekvienos koncentracijos smailių aukščiai (arba plotai). Kalibracinė kreivė nubrėžiama ordinačių ašyje atidedant kalibracinių tirpalų smailių aukščių (arba plotų) vidurkius, o abscisių ašyje – jų atitinkamas koncentracijas µg/ml.

5.4.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus įleidžiamas toks pats mėginio ekstrakto kiekis (5.3.2), koks naudojamas kalibraciniams tirpalams, ir išmatuojama halofuginono smailių vidutinis aukštis (plotas).

6. **Rezultatų apskaičiavimas**

Iš mėginio tirpalo halofuginono smailių vidutinio aukščio (ploto) pagal kalibracinę kreivės (5.4.2) nustatoma mėginio tirpalo koncentracija µg/ml.

Halofuginono kiekis w (mg/kg) mėginyje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kurioje:

c: halofuginono koncentracija mėginio tirpale µl/ml,

m: matavimui paimtos mėginio dalies masė gramais.

7. **Rezultatų patvirtinimas**

7.1. **Tapatumas**

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografija arba, naudojant diodinę matricą, su kuria palyginami mėginio ekstrakto ir kalibracinio tirpalo (3.6.2), turinčio 6,0 μg/ml, spektrai.

7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstrakto tirpalo koncentracija padidinama, įlašinant tinkamą kalibracinio tirpalo kiekį (3.6.2). Pridėto halofuginono kiekis turi būti panašus į išmatuotą halofuginono kiekį, mėginio ekstrakte.

Turi padidėti tiktai halofuginono smailės aukštis, atsižvelgus ir į pridėtą kiekį, ir į ekstrakto atskiedimą. Smailės plotis, pusėje jos aukščio turėtų būti ± 10 % nepapildyto mėginio ekstrakto halofuginono smailės pločio.

7.1.2. Detekcija diodine matrica

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

a) mėginio ir standarto spektrų absorbcijos maksimumų bangų ilgiai, užregistruoti chromatogramų smailės viršūnėje, turi būti vienodi ir paklaida neturi viršyti detekcinės sistemos skiriamosios gebos sąlygojamų ribų. Šios ribos detekcijai diodine matrica paprastai yra ± 2 nm;

b) tarp 225 ir 300 nm, užregistruoti mėginio ir standarto chromatogramų smailių viršūnių spektrai neturi skirtis, kai santykinė absorbcija yra nuo 10 % iki 100 %. Šis kriterijus patenkinamas, kai, esant tam pačiam absorbcijos maksimumui, nėra nei vieno taško, kuriame nuokrypis tarp dviejų spektrų viršytų 15 % standarto analitės absorbcijos;

c) tarp 225 ir 300 nm, mėginio ekstrakto chromatogramos smailės pakilimo, viršūnės ir nusileidimo spektrai neturi skirtis vienas nuo kito, kai santykinė absorbcija yra nuo 10 % iki 100 %. Šis kriterijus patenkinamas, kai esant tam pačiam absorbcijos maksimumui, visuose stebimuose taškuose nuokrypis tarp spektrų neviršija 15 % smailės viršūnės spektro absorbcijos.

Jeigu netenkinamas nors vienas iš šių kriterijų, analitės buvimas nepatvirtinamas.

7.2. **Pakartojamumas**

Skirtumas tarp dviejų lygiagrečiai atliktų to paties mėginio matavimų rezultatų neturi viršyti 0,5 mg/kg, kai halofuginono yra iki 3 mg/kg.

7.3. **Išgava**

Išgava su tuščiuoju papildytu mėginiu turi būti ne mažesnė kaip 80 %.

8. **Tarplaboratorinių tyrimų rezultatai**

Buvo organizuoti tarplaboratoriniai tyrimai ([1]), kurių metu aštuonios laboratorijos atliko trijų mėginių analizę.

Rezultatai

	A mėginys („tuščiasis“ pašaras) ištirtas nedelsiant	B mėginys (miltai)		C mėginys (granulės)	
		ištirtas nedelsiant	po dviejų mėn.	ištirtas nedelsiant	po dviejų mėn.
Vidurkis(1)	n. d.	2,80	2,42	2,89	2,45
SŘ	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CVŘ	–	16	18	14	17
išg.		86	74	88	75

([1]): vienetai mg/kg.
n. d.: nerasta.
SŘ: standartinis pakartojamumo nuokrypis.
CVŘ: pakartojamumo variacijos koeficientas (%).
išg.: išgava (%).

([1]) *The Analyst* 108, 1983, p. 1252–1256.