31993L0070

17.9.1993. *EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS* L 234/17

KOMISIJAS VIENPADSMITĀ DIREKTĪVA 93/70/EEK

(1993. gada 28. jūlijs),

ar ko nosaka Kopienas analīzes metodes barības oficiālai kontrolei

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei ([1]), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EEK) Nr. 3768/85 ([2]), un jo īpaši tās 2. pantu,

tā kā Direktīvā 70/373/EEK ir prasība, ka barības oficiālu kontroli, kuras nolūks ir pārbaudīt atbilstību prasībām, kas izriet no normatīviem un administratīviem aktiem, kuri attiecas uz kvalitāti un sastāvu, izdara pēc paraugu ņemšanas un analīzes Kopienas metodēm;

tā kā būtu jāievieš Kopienas analīzes metode attiecībā uz halofuginona piedevu, lai pārbaudītu, vai tās lietojums atbilst nosacījumiem, kas attiecas uz tās lietojumu barībā;

tā kā šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis prasa, lai halofuginona satura analīzes barības oficiālas pārbaudes nolūkos izdara pēc šīs direktīvas pielikumā aprakstītās metodes.

2. pants

Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai līdz 1994. gada 30. jūnijam panāktu atbilstību šai direktīvai. Par to dalībvalstis tūlīt informē Komisiju.

Kad dalībvalstis pieņem minētos noteikumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu, vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālajai publikācijai. Šādas atsauces pievienošanas kārtību paredz dalībvalstis.

3. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1993. gada 28. jūlijā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

René STEICHEN

([1]) OV L 170, 3.8.1970., 2. lpp.
([2]) OV L 362, 31.12.1985., 8. lpp.

PIELIKUMS

HALOFUGINONA NOTEIKŠANA

DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-hinazolīn-4-(3H)-ona bromūdeņražskābes sāls

1. **Mērķis un piemērošanas joma.**

Šī metode ir paredzēta halofuginona noteikšanai barībā. Zemākā noteikšanas robeža ir 1 mg/kg.

2. **Princips.**

Pēc apstrādes ar karstu ūdeni halofuginonu kā brīvu bāzi ekstrahē etilacetātā un pēc tam atdala kā sālsskābes sāli skābes ūdens šķīdumā. Ekstraktu attīra jonu apmaiņas hromatogrāfijā. Halofuginona saturu noteic apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijā (HPLC), lietojot UV detektoru.

3. **Reaģenti.**

3.1. Acetonitrils ar HPLC tīrības pakāpi.

3.2. Amberlīta XAD-2 sveķi.

3.3. Amonija acetāts.

3.4. Etilacetāts.

3.5. Ledus etiķskābe.

3.6. Halofuginona standartviela (DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-hinazolīn-4-(3H)-ona bromūdeņražskābes sāls E 764).

3.6.1. Halofuginona rezerves standartšķīdums, 100 µg/ml.

Ar 0,1 mg precizitāti 500 ml mērkolbā iesver 50 mg halofuginona (3.6.), izšķīdina amonija acetāta buferšķīdumā (3.18.), uzpilda līdz svītrai ar buferšķīdumu un samaisa. Tumšā vietā 5 °C temperatūrā šo šķīdumu var glabāt trīs nedēļas.

3.6.2. Kalibrēšanas šķīdumi.

100 ml kalibrētās kolbās iepilda attiecīgi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 un 6,0 ml rezerves standartšķīduma (3.6.1.). Uzpilda līdz svītrai ar kustīgo fāzi (3.21.) un samaisa. Šo šķīdumu koncentrācija ir attiecīgi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, un 6,0 mg/ml halofuginona. Šie šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

3.7. Sālsskābe (ρ_{20} aptuveni 1,16 g/ml).

3.8. Metanols.

3.9. Sudraba nitrāts.

3.10. Nātrija askorbāts.

3.11. Nātrija karbonāts.

3.12. Nātrija hlorīds.

3.13. EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls).

3.14. HPLC kvalitātes ūdens.

3.15. Nātrija karbonāta šķīdums, δ = 10 g/100 ml.

3.16. Ar nātrija hlorīdu piesātināts nātrija karbonāta šķīdums, δ = 5 g/100 ml.

Izšķīdina 50 g nātrija karbonāta (3.11.) ūdenī, atšķaida līdz 1 l un pievieno nātrija hlorīdu (3.12.), līdz šķīdums ir piesātināts.

3.17. Sālsskābe, apmēram 0,1 mol/l.

Atšķaida 10 ml HCl (3.7.) ar ūdeni līdz 1 l.

3.18. Amonija acetāta buferšķīdums, apmēram 0,25.

Izšķīdina 19,3 g amonija acetāta (3.3.) un 30 ml etiķskābes (3.5.) ūdenī (3.14.) un atšķaida līdz 1 l.

3.19. Amberlīta XAD-2 sveķu gatavošana.

Attiecīgu daudzumu amberlīta (3.2.) mazgā ar ūdeni, līdz visi hlorīda joni ir atdalīti, par ko liecina nolietās ūdens fāzes sudraba nitrāta (3.20.) tests. Pēc tam sveķus mazgā ar 50 ml metanola (3.8.), metanolu nolej un sveķus glabā svaigā metanolā.

3.20. Sudraba nitrāta šķīdums, apmēram 0,1 mol/l.

0,17 g sudraba nitrāta (3.9.) izšķīdina 10 ml ūdens.

3.21. HPLC kustīgā fāze.

500 ml acetonitrila (3.1.) sajauc ar 300 ml amonija acetāta buferšķīduma (3.18.) un 1 200 ml ūdens (3.14.). Ar etiķskābi (3.5.) panāk pH 4,3. Izfiltrē caur 0,22 μm filtru (4.8.) un degazē šķīdumu, piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu. Šis šķīdums glabājas nemainīgs vienu mēnesi, ja to glabā tumšā vietā, slēgtā traukā.

4. **Iekārta.**

4.1. Ultraskaņas vanna.

4.2. Rotācijas ietvaicētājs.

4.3. Centrifūga.

4.4. HPLC iekārta, kurai ir ultravioletais detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodu matricas detektors.

4.4.1. Šķidruma hromatogrāfa kolonna, 300 mm 4 mm, C 18, 10 μm blīve, vai līdzvērtīga kolonna.

4.5. Stikla kolonna (300 mm 10 mm), kas aprīkota ar keramiskā stikla filtru un krānu.

4.6. Stiklšķiedras filtri ar 150 mm diametru.

4.7. Membrānas filtri, 0,45 μm.

4.8. Membrānas filtri, 0,22 μm.

5. **Darba gaita.**

Piezīme: halofuginons kā brīva bāze sārmainos un etilacetāta šķīdumos ir nestabils. To nevajadzētu atstāt etilacetātā ilgāk par 30 minūtēm.

5.1. Vispārīgi noteikumi.

5.1.1. Lai pārbaudītu halofuginona un traucējošu vielu neesamību, būtu jāizdara tukšais eksperiments.

5.1.2. Reģenerācijas tests būtu jāizdara, analizējot tukšo kontrolbarību, kura ir stiprināta, pievienojot tādu daudzumu halofuginona, kas ir līdzīgs paraugā esošajam. Lai stiprinātu 3 mg/kg līmenī, pievieno 300 μl rezerves standartšķīduma (3.6.1.) 10 gramiem tukšās kontrolbarības, samaisa un atstāj uz 10 minūtēm, pirms sāk ekstrakciju (5.2.).

Piezīme: lietojot šo metodi, tukšajai kontrolbarībai pēc veida vajadzētu būt līdzīgai paraugam, un analīzē nevajadzētu atklāties halofuginonam.

5.2. Ekstrakcija.

Ar 0,1 g precizitāti 200 ml centrifūgas stobriņā iesver 10 g sagatavotā parauga, pievieno 0,5 g nātrija askorbāta (3.10.), 0,5 g EDTA (3.13.) un 20 ml ūdens un samaisa. Stobriņu uz 5 minūtēm liek ūdens vannā (80 °C). Pēc atdzišanas līdz istabas temperatūrai pievieno 20 ml nātrija karbonāta šķīduma (3.15.) un samaisa. Tūlīt pievieno 100 ml etilacetāta (3.4.) un ar roku spēcīgi krata 15 sekundes. Tad stobriņu uz trijām minūtēm liek ultraskaņas vannā (4.1.), un atbrīvo aizbāzni. Centrifugē divas minūtes, un caur stiklšķiedras filtru (4.6.) etilacetāta fāzi dekantē 500 ml šķirpiltuvē. Parauga ekstrakciju atkārto ar otru 100 ml etilacetāta devu. Apvienotos ekstraktus vienu minūti mazgā ar 50 ml nātrija karbonāta šķīduma, kas piesātināts ar nātrija hlorīdu (3.16.), un nolej ūdens slāni.

1 min. ar 50 ml sālsskābes (3.17.) ekstrahē organisko slāni. Apakšējo skābes slāni nolaiž 250 ml šķirpiltuvē. 1,5 minūtes ar vēl vienu 50 ml sālsskābes devu atkārtoti ekstrahē organisko slāni, un to pievieno pirmajam ekstraktam. Apvienotos skābes ekstraktus mazgā ar 10 ml etilacetāta (3.4.), kratot apmēram 10 sekundes.

Ūdens slāni kvantitatīvi pārnes uz 250 ml apaļkolbu, un nolaiž organisko fāzi. Ar rotācijas ietvaicētāju (2.4.) ietvaicē visu atlikušo etilacetātu no skābes šķīduma. Ūdens vannas temperatūrai nevajadzētu pārsniegt 40 °C. Apmēram 25 mbar vakuumā 38 °C viss etilacetāta atlikums atdalīsies apmēram 5 minūtēs.

5.3. Attīrīšana.

5.3.1. Amberlīta kolonnas gatavošana.

Katram parauga ekstraktam gatavo XAD-2 kolonnu. 10 g sagatavotā amberlīta (3.19.) pārnes uz stikla kolonnu (4.5.) ar metanolu (3.8.). Sveķu slāņa virspusē pieliek nelielu stikla vates tamponu. Notecina metanolu no kolonnas, un sveķus mazgā ar 100 ml ūdens, plūsmu apturot, kad šķidrums sasniedz sveķu slāņa virsu. 10 minūtes pirms lietošanas ļauj kolonnai nostabilizēties. Kolonna nedrīkst iztecēt sausa.

5.3.2. Parauga attīrīšana.

Estraktu (5.2.) kvantitatīvi pārnes uz sagatavotās amberlīta kolonnas (5.3.1.) augšgalu un eluē, nolejot eluātu. Eluācijas ātrumam nevajadzētu pārsniegt 20 ml/min. Apaļkolbu izskalo ar 20 ml sālsskābes (3.17.), un ar saskalojumu mazgā sveķu kolonnu. Skābes šķīduma atlikumu izpūš ar gaisa strūklu. Nolej saskalojumus. Kolonnai pievieno 100 ml metanola (3.8.) un 5 – 10 ml ļauj eluēties, savāc eluātu 250 ml apaļkolbā. Atlikušo metanolu atstāj 10 minūtes, lai nostabilizējas ar sveķiem, un turpina eluāciju ar ātrumu 20 ml/min., eluātu savāc tajā pašā apaļkolbā. Ar rotācijas ietvaicētāju (4.2.) ietvaicē metanolu, ūdens vannas temperatūrai nevajadzētu būt augstākai par 40 °C. Atlikumu kvantitatīvi pārnes uz 10 ml mērkolbu, lietojot kustīgo fāzi (3.21.). Uzpilda līdz svītrai ar kustīgo fāzi un samaisa. Alikvotu daļu izfiltrē caur membrānas filtru (4.7.). Šo šķīdumu glabā HPLC noteikšanai (5.4.).

5.4. HPLC noteikšana.

5.4.1. Parametri.

Ieteicams vadīties pēc šādām nostādnēm, citus nosacījumus var izvirzīt, ja tie dod līdzvērtīgus rezultātus.

Šķidruma hromatogrāfa kolonna (4.4.1.).

HPLC kustīgā fāze (3.21.).

Tecēšanas ātrums: no 1,5 līdz 2 ml/min.

Viļņu garums noteikšanai: 243 nm.

Iešprices tilpums: no 40 līdz 100 µl.

Pārbauda hromatogrāfijas sistēmas stabilitāti, vairākas reizes iešpricējot kalibrēšanas šķīdumu (3.6.2.), kas satur 3,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgu pīķa augstumu (vai laukumu) un kavējuma laiku.

5.4.2. Kalibrēšanas grafiks.

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.6.2.) iešpricē vairākas reizes, un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos pīķu augstumus (laukumus). Uzzīmē kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos pīķa augstumus vai laukumus un uz abscisu ass atbilstīgās koncentrācijas µg/ml.

5.4.3. Parauga šķīdums.

Iešpricē parauga ekstraktu (5.3.2.) vairākas reizes, ievērojot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka halofuginona pīķa vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana.**

Nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml pēc parauga šķīduma halofuginona pīķa vidējā augstuma (laukuma), salīdzinot ar kalibrēšanas grafiku (5.4.2.).

Halofuginona saturu w (mg/kg) paraugā aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

c: parauga šķīduma halofuginona koncentrācija µg/ml,

m: analizējamās porcijas masa gramos.

7. **Rezultātu izvērtējums.**

7.1. Ķīmiskais nosaukums.

Nosakāmās komponentes identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskajā analīzē vai lietojot diodu matricas detektoru, ar ko salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.6.2.) spektru, kurš satur 6,0 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze.

Parauga ekstraktu stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.6.2.). Pievienotā halofuginona daudzumam vajadzētu būt līdzīgam aprēķinātajam parauga ekstraktā atrastajam halofuginona daudzumam.

Tikai halofuginona pīķa augstums būtu jāpalielina, ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu. Pīķa platumam pusē no tā maksimālā augstuma jābūt ± 10 % no pamatnes platuma.

7.1.2. Atklāšana ar diodu matricas detektoru.

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektru viļņu garumam, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, jābūt vienādam atklāšanas/detektora sistēmas izšķirtspējas noteiktās robežās. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir ± 2 nm;

b) no 225 līdz 300 nm parauga un standartspektri, ko reģistrē pīķa smailē hromatogrammā, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir nodrošināta, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojamā punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmās vielas standarta absorbcijas;

c) no 225 līdz 300 nm parauga ekstrakta pīķa kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir no 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir nodrošināta, ja maksimumi sakrīt un ja nevienā novērojamā punktā novirze starp spektriem nepārsniedz 15 % no smailes spektra absorbcijas.

Ja nav atbilstības vienam no šiem kritērijiem, nosakāmās vielas klātbūtne nav apstiprināta.

7.2. Atkārtojamība.

Atšķirība starp divu paralēli izdarītu viena un tā paša parauga analīžu rezultātiem nedrīkst pārsniegt 0,5 mg/kg, ja halofuginona saturs ir līdz 3 mg/kg.

7.3. Atgūstamība.

Stiprināta tukšā kontrolparauga atgūstamībai vajadzētu būt vismaz 80 %.

8. **Salīdzinoša pētījuma rezultāti.**

Salīdzinošā pētījumā ([1]) astoņās laboratorijās analizēja trīs paraugus.

Rezultāti

	Paraugs A (tukšs) saņemot	Paraugs B (saberzts)		Paraugs C (zirnīšu formā)	
		Saņemot	Pēc diviem mēnešiem	Saņemot	Pēc diviem mēnešiem
Vidēji ([1])	n.n.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	–	16	18	14	17
Atg.		86	74	88	75

([1]): mg/kg.
n.n.: nav noteikts.
S_R: reproducējamības vidējā kvadrātiskā novirze.
CV_R: variāciju koeficients (%).
Atg.: atgūstamība (%).

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