31993L0117

KOMISIJAS DIVPADSMITĀ DIREKTĪVA 93/117/EK

(1993. gada 17. decembris),

ar ko nosaka Kopienas analīzes metodes oficiālai barības kontrolei

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrole [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 prasīts veikt barības oficiālu kontroli, kuras nolūks ir pārbaudīt atbilstību prasībām, kas izriet no normatīviem un administratīviem aktiem, kuri attiecas uz kvalitāti un sastāvu, izmantojot Kopienas paraugu ņemšanas un analīzes metodes;

tā kā Kopienas analīzes metodes attiecībā uz piedevām robenidīnu un metilbenzokvātu būtu jāievieš, lai pārbaudītu atbilstību nosacījumiem par to lietošanu dzīvnieku barībā;

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

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis nosaka to, ka analīzēs, ko izdara barības oficiālās pārbaudēs, lai noskaidrotu robenidīna un metilbenzokvāta saturu, jālieto šīs direktīvas pielikumā aprakstītās metodes.

2. pants

Normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi lai nodrošinātu atbilstību šai direktīvai, dalībvalstīs stājas spēkā vēlākais līdz 1994. gada 30. novembrim, un par to dalībvalstis tūlīt informē Komisiju.

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

3. pants

Šī direktīva stājas spēkā trešajā dienā pēc publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

Briselē, 1993. gada 17. decembrī

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

1. **ROBENIDĪNA NOTEIKŠANA**

1,3-bis[(4-hlorbenzilidēn)amino] guanidīna sālsskābes sāls

1. **Mērķis un lietošanas joma.**

Šī metode ir paredzēta robenidīna noteikšanai barībā. Zemākā noteikšanas robeža ir 5 mg/kg.

2. **Princips.**

Paraugu ekstrahē ar paskābinātu metanolu. Ekstraktu žāvē un alikvoto daļu attīra uz alumīnija oksīda kolonnas. Robenidīnu no kolonnas eluē ar metanolu, kas ir koncentrēts un uzpildīts līdz attiecīgam tilpumam ar kustīgo fāzi. Robenidīna saturu nosaka apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidrumu hromatogrāfijā (HPLC), lietojot UV detektoru.

3. **Reaģenti.**

3.1. *Metanols.*

3.2. *Paskābināts metanols.*

4,0 ml sālsskābes (P20c., 1,18 g/ml) iepilda 500 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar metanolu (3.1.) un sajauc. Šis šķīdums būtu jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.3. *HPLC kvalitātes acetonitrils.*

3.4. *Molekulārais siets.*

3.A tips, ar 8 līdz 12 *mesh* graudiņi (1,6 – 2,5 mm graudiņi, kristālisks alumosilikāts, poru diametrs 0,3 mm).

3.5. *Alumīnija oksīds: I aktivitātes kvalitātes skābs alumīnija oksīds kolonnas hromatogrāfijai.*

100 g alumīnija oksīda liek attiecīgā traukā un pievieno 2,0 ml ūdens. Aiztaisa un krata apmēram 20 minūtes. Glabā cieši noslēgtā traukā.

3.6. *Kālija dihidrogēnfosfāta šķīdums, c = 0,025 mol/l.*

Izšķīdina 3,40 g kālija dihidrogēnfosfāta HPLC kvalitātes ūdenī 1,000 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei un sajauc.

3.7. *Dinātrija hidrogēnfosfāta šķīdums, c = 0,025 mol/l.*

Izšķīdina 3,55 g bezūdens (vai 4,45 g dihidrāta, vai 8,95 g dodekahidrāta) dinātrija hidrogēnfosfāta HPLC kvalitātes ūdenī 1,000 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei un sajauc.

3.8. *HPLC kustīgā fāze.*

Sajauc kopā šādus reaģentus:

650 mlacetonitrila (3.3.),

250 ml HPLC kvalitâtes ûdens,

50 ml kâlija dihidrogçnfosfâta ðîíduma (3.6.),

50 ml dinâtrija hidrogçnfosfâta ðîíduma (3.7.).

Izfiltrē caur 0,22 µm filtru (4.6.) un degazē šķīdumu (piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu).

3.9. *Standartviela.*

Tīrs robenidīns: 1.3-bis[(4-hlorbenzilidēn)amino] guanidīna sālsskābes sāls E 750.

3.9.1. Robenidīna izejas standartšķīdums: 300 µg/ml:

Ar precizitāti līdz 0,1 mg nosver 30 mg robenidīna standartvielas (3.9.). Izšķīdina paskābinātā metanolā (3.2.) 100 ml mērkolbā, ar to pašu šķīdinātāju uzpilda līdz zīmei un sajauc. Ietin kolbu alumīnija folijā un glabā tumšā vietā.

3.9.2. Robenidīna standartšķīdums: 12 µg/ml.

10,0 ml izejas standartšķīduma (3.9.1.) iepilda 250 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.8.) un sajauc. Ietin kolbu alumīnija folijā un glabā tumšā vietā.

3.9.3. Kalibrēšanas šķīdumi.

50 ml kalibrētās kolbās iepilda attiecīgi 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 un 25,0 ml standartšķīduma (3.9.2.). Uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.8.) un sajauc. Šie šķīdumi atbilst attiecīgi 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 un 6,0 µg/ml robenidīna. Šie šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

4. **Iekārta.**

4.1. *Stikla kolonna.*

Izgatavota no dzeltenā stikla, aprīkota ar krānu un rezervuāru, kura tilpums ir apmēram 150 ml, iekšējais diametrs no 10 līdz 15 mm, garums 250 mm.

4.2. *Laboratorijas manuālais kratītājs.*

4.3. *Rotācijas ietvaicētājs.*

4.4. *HPLC iekārta, kurai ir ultravioletais detektors ar maināmu viļņu garumu vai diodu matricas detektors, kas darbojas 250 līdz 400 mm diapazonā.*

4.4.1. *Šķidrumu hromatogrāfa kolonna: 300 mm 4 mm, C18, 10 µm blīve vai līdzvērtīga.*

4.5. *Stiklšķiedras filtrpapīrs (Whatman GF/A vai līdzvērtīgs).*

4.6. *Membrānas filtri, 0,22 µm.*

4.7. *Membrānas filtri, 0,45 µm.*

5. **Procedūra.**

Piezīme: robenidīns ir gaismasjutīgs. Visās operācijās būtu jālieto dzeltenā stikla trauki.

5.1. Vispārīgi noteikumi.

5.1.1. Lai pārbaudītu robenidīna un traucējošu vielu neesamību, būtu jāveic kontrolbarības analīze.

5.1.2. Reģenerācijas tests būtu jāizdara, analizējot kontrolbarību (5.1.1.), kura ir stiprināta, pievienojot tādu daudzumu robenidīna, kas ir līdzīgs paraugā esošajam. Lai stiprinātu līdz līmenim 60 mg/kg, 3,0 ml izejas standartšķīduma (3.9.1.) iepilda koniskā 250 ml kolbā. Ietvaicē šķīdumu līdz aptuveni 0,5 ml slāpekļa atmosfērā. Pievieno 15 g kontrolbarības, sajauc un atstāj uz 10 minūtēm, pirms sāk ekstrakciju (5.2.).

Piezīme: lietojot šo metodi, par kontrolbarību vajadzētu izmantot tāda paša tipa barību kāda ir paraugā un analīzēs nevajadzētu tikt konstatētam robenidīnam.

5.2. *Ekstrakcija.*

Ar precizitāti līdz 0,01 g nosver apmēram 15 g sagatavotā parauga. Pārnes koniskā 250 ml kolbā un pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.2.), aiztaisa un krata vienu stundu kratītājā (4.2.). Izfiltrē šķīdumu caur stiklšķiedras filtrpapīru (4.5.) un visu filtrātu savāc koniskā 150 ml kolbā. Pievieno 7,5 g molekulārā sieta (3.4.), aiztaisa un krata piecas minūtes. Nekavējoties izfiltrē caur stiklšķiedras filtrpapīru. Šo šķīdumu glabā attīrīšanai (5.3.).

5.3. *Attīrīšana.*

5.3.1. Alumīnija oksīda kolonnas gatavošana.

Nelielu stikla vates tamponu ieliek stikla kolonnas (4.1.) apakšējā galā un saspiež ar stikla spieķīti. Nosver 11,0 g sagatavotā alumīnija oksīda (3.5.) un ieliek kolonnā. Šajā stadijā būtu pēc iespējas jāsamazina gaisa iedarbība. Viegli uzsit pa uzpildīto kolonnu tās apakšējā galā, lai alumīnija oksīds sablīvējas.

5.3.2. Parauga attīrīšana.

Ar pipeti uz kolonnu pārnes 5,0 ml sagatavotā parauga ekstrakta (5.2.). Pieliek pipetes galu tuvu pie kolonnas sienas un ļauj šķīdumam iesūkties alumīnija oksīdā. Robenidīnu no kolonnas eluē ar 100 ml metanola (3.1.) ar plūsmas ātrumu no 2 līdz 3 ml/minūtē un savāc eluātu 250 ml apaļkolbā. Ar rotācijas ietvaicētāju (4.3.) ietvaicē metanola šķīdumu līdz sausam stāvoklim 40 °C temperatūrā pazeminātā spiedienā. Atlikumu no jauna izšķīdina 3 līdz 4 ml kustīgās fāzes (3.8.) un kvantitatīvi pārnes uz 10 ml mērkolbu. Kolbu izskalo ar vairākām 1 līdz 2 ml kustīgās fāzes devām, un saskalojumus pārnes uz mērkolbu. Uzpilda līdz zīmei ar to pašu šķīdinātāju un sajauc. Alikvoto daļu izfiltrē caur 0,45 µm membrānas filtru (4.7.). Šo šķīdumu glabā HPLC noteikšanai (5.4.).

5.4. *HPLC noteikšana.*

5.4.1. Parametri.

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus, citos apstākļos var strādāt, ja tie dod līdzvērtīgus rezultātus:

Šķidruma hromatogrāfa kolonna (4.4.1.):

HPLC kustīgā fāze (3.8.),

Plūsmas ātrums: 1,5 līdz 2 ml/minūtē,

Detektora viļņu garums: 317 nm,

Iešļircinātais tilpums: 20 līdz 50 µl.

Pārbauda hromatogrāfijas sistēmas stabilitāti, vairākas reizes iešļircinot kalibrēšanas šķīdumu (3.9.3.), kas satur 3,6 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgu pīķu augstumu un aiztures laiku.

5.4.2. Kalibrēšanas grafiks.

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.9.3.) iešļircina vairākas reizes, un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos pīķu augstumus (laukumus). Uzzīmē kalibrācijas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos pīķu augstumus vai laukumus un uz abscisu ass atbilstošās koncentrācijas miligramos uz mililitru.

5.4.3. Parauga šķīdums.

Iešļircina parauga ekstraktu (5.3.2.) vairākas reizes, ņemot tādu pašu tilpumu kā kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka robenidīna pīķu vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana.**

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

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

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

kur:

c = robenidīna koncentrācija parauga šķīdumā lg/ml,

m = analizējamā parauga masa gramos.

7. **Rezultātu izvērtējums.**

7.1. *Identifikācija.*

Nosakāmā komponenta identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskā noteikšanā vai lietojot diodu matricas detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.9.3.) spektru, kurš satur 6 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā noteikšana.

Parauga ekstraktu stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.9.3.). Pievienotā robenidīna daudzumam vajadzētu būt līdzīgam aprēķinātajam parauga ekstraktā atrastajam robenidīna daudzumam.

Tikai robenidīna pīķa augstumam būtu jāpalielinās, ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu. Pīķa platumam vietā, kas ir puse no tā maksimālā augstuma, jābūt apmēram 10 % no platuma pīķa apakšā.

7.1.2. Konstatēšana ar diodu matricas detektoru.

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektra viļņu garumiem, ko reģistrē pīķa virsotnē hromatogrammā, jābūt vienādiem detektora sistēmas izšķirtspējas noteiktās robežās. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir apmēram līdz 2 nm;

b) starp 250 un 400 nm, paraugs un standartspektri, kas reģistrēti hromatogrammas pīķa virsotnē, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir panākta, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojamā punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmā standarta komponenta absorbcijas;

c) starp 250 un 400 nm, parauga ekstrakta pīķa kāpuma, smailes un krituma spektri cits no cita nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir panākta, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojamā punktā novirze starp spektriem nepārsniedz 15 % no smailes spektra absorbcijas.

Ja nav atbilstības kaut vienam no šiem kritērijiem, nosakāmā komponenta esamība nav apstiprināta.

7.2. *Atkārtojamība.*

Atšķirība starp divu vienam un tam pašam paraugam paralēli veiktu noteikšanu rezultātiem nedrīkst pārsniegt 10 % no lielākā rezultāta, kur robenidīna saturs pārsniedz 15 mg/kg.

7.3. *Reģenerācija.*

Stiprināta kontrolparauga reģenerācijai vajadzētu būt vismaz 85 %.

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti.**

Kopiena noorganizēja salīdzinošu pētījumu, kurā 12 laboratorijās analizēja četrus saberztas vai zirnīšu formas mājputnu un trušu barības paraugus. Katru paraugu analizēja divas reizes. Rezultāti ir apkopoti šajā tabulā:

	Mājputnu barība		Trušu barība	
	Saberzta	Granulēta	Saberzta	Granulēta
Vidēji (mg/kg)	27,00	27,99	43,6	40,1
Sr (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CVr (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
Sr (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CVR (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Reģenerācija (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr = atkārtojamības vidējā kvadrātiskā novirze.
CVr = atkārtojamības variāciju koeficients.
SR = reproducējamības vidējā kvadrātiskā novirze.
CVR = reproducējamības variāciju koeficients.

2. METILBENZOKVĀTA NOTEIKŠANA

7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-hinolona

1. **Mērķis un lietošanas joma.**

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

2. **Princips.**

Metilbenzokvātu no parauga ekstrahē ar metānsulfonskābes šķīdumu metilspirtā. Ekstraktu attīra ar dihlormetānu jonu apmaiņas hromatogrāfijā un pēc tam vēlreiz ar dihlormetānu. Metilbenzokvāta saturu nosaka ar UV detektoru apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfijā (HPLC).

3. **Reaģenti.**

3.1. Dihlormetāns.

3.2. HPLC kvalitātes metanols.

3.3. HPLC kustīgā fāze:

metanola (3.2.) un HPLC kvalitātes ūdens maisījums 75 + 25 (v + v).

Izfiltrē caur 0,22 μm filtru (4.5.) un degazē šķīdumu (piemēram, 10 minūtes apstrādājot ar ultraskaņu).

3.4. Metānsulfonskābes šķīdums, σ = 2 %.

Atšķaida 20,0 ml metānsulfonskābes līdz 1 000 ml ar metanolu (3.2.).

3.5. Sālsskābes šķīdums, σ = 10 %.

Atšķaida 100 ml sālsskābes (P20 c, 1,18 g/ml) līdz 1 000 ml ar ūdeni.

3.6. Katjonu apmaiņas Amberlita sveķi CG-120 (Na), 100 līdz 200 *mesh*.

Pirms lietošanas sveķus apstrādā: uzduļķo masu no 100 g sveķu un 500 ml sālsskābes šķīduma (3.5.) un, nepārtraukti maisot, karsē uz elektriskās plītiņas, līdz sāk vārīties. Ļauj atdzist un nolej nost skābi. Vakuumā izfiltrē caur filtrpapīru. Sveķus divas reizes mazgā ar 500 ml ūdens un pēc tam ar 250 ml metanola (3.2.). Sveķus skalo vēl ar 250 ml metanola, un ar caurplūstošu gaisu žāvē nogulsnes, kas paliek uz filtra. Nožāvētos sveķus glabā noslēgtā pudelē.

3.7. Standartviela: tīrs metilbenzokvāts (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-hinolons).

3.7.1. Metilbenzokvāta izejas standartšķīdums, 500 μg/ml.

Ar precizitāti līdz 0,1 mg nosver 50 mg standartvielas (3.7.), izšķīdina metānsulfonskābes šķīdumā (3.4.) 100 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei un sajauc.

3.7.2. Metilbenzokvāta standartšķīdums, 50 μg/ml.

5,0 ml izejas standartšķīduma (3.7.1.) pārnes uz 50 ml mērkolbu, uzpilda līdz zīmei ar metanolu (3.2.) un sajauc.

3.7.3. Kalibrēšanas šķīdumi.

Pārnes 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, un 5,0 ml metilbenzokvāta standartšķīduma (3.7.2.) uz 25 ml mērkolbām. Uzpilda līdz zīmei ar kustīgo fāzi (3.3.) un sajauc. Šajos šķīdumos metilbenzokvāta koncentrācija ir attiecīgi 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, un 10,0 mg/ml. Šie šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

4. **Iekārta.**

4.1. Laboratorijas kratītājs.

4.2. Rotācijas ietvaicētājs.

4.3. Stikla kolonna (250 mm 15 mm), kas aprīkota ar krānu un rezervuāru, kura tilpums ir apmēram 200 ml.

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

4.4.1. Šķidrumu hromatogrāfa kolonna: 300 mm 4 mm, C-18, 10 μm vai līdzvērtīga blīve.

4.5. Membrānas filtri, 0,22 μm.

4.5. Membrānas filtri, 0,45 μm.

5. **Procedūra.**

5.1. *Vispārīgi noteikumi.*

5.1.1. Lai pārbaudītu metilbenzokvāta un traucējošu vielu neesamību, būtu jāveic kontrolbarības analīze.

5.1.2. Būtu jāveic reģenerācijas tests, analizējot kontrolbarību, kura ir stiprināta, pievienojot tādu daudzumu metilbenzokvāta, kas ir līdzīgs paraugā esošajam. Lai stiprinātu 15 mg/kg līmenī, pievieno 600 μl izejas standartšķīduma (3.7.1.) 20 gramiem kontrolbarības, sajauc un atstāj uz 10 minūtēm pirms sāk ekstrakciju (5.2.).

Piezīme: lietojot šo metodi, par kontrolbarību vajadzētu izmantot tāda paša tipa barību kāda ir paraugā, un analīzēs nevajadzētu tikt konstatētam metilbenzokvātam.

5.2. *Ekstrakcija.*

Ar precizitāti līdz 0,01 g nosver apmēram 20 g sagatavotā parauga un pārnes uz konisku 250 ml kolbu. Pievieno 100,0 ml metānsulfonskābes šķīduma (3.4.) un mehāniski krata (4.1.) 30 minūtes. Izfiltrē šķīdumu caur filtrpapīru, un filtrātu glabā divu šķidro fāžu atdalīšanai (5.3.).

5.3. *Divu šķidro fāžu atdalīšana.*

Uz 500 ml dalāmo piltuvi, kurā ir 100 ml sālsskābes šķīduma (3.5.), pārnes 25,0 ml iegūtā filtrāta (5.2.). Pievieno 100 ml dihlormetāna (3.1.) un krata vienu minūti. Ļauj slāņiem atdalīties un nolaiž apakšējo (dihlormetāna) slāni 500 ml apaļkolbā. Ūdens fāzes ekstrakciju atkārto ar vēl divām 40 ml dihlormetāna devām un apvieno tās ar pirmo ekstraktu apaļkolbā. Ar rotācijas ietvaicētāju (4.2.) pazeminātā spiedienā 40 °C temperatūrā ietvaicē dihlormetāna ekstraktu līdz sausam stāvoklim. Izšķīdina atlikumu 20 līdz 25 ml metanola (3.2.), aiztaisa kolbu un visu ekstraktu glabā jonu apmaiņas hromatogrāfijai (5.4.).

5.4. *Jonu apmaiņas hromatogrāfija.*

5.4.1. Katjonu apmaiņas kolonnas sagatavošana.

Stikla kolonnas (4.3.) apakšējā galā ieliek stikla vates tamponu. Sagatavo 5,0 g apstrādāto katjonu apmaiņas sveķu (3.6.) un 50 ml sālsskābes (3.5.) uzduļķojuma, ielej stikla kolonnā un ļauj nostāties. Nolaiž lieko skābi tā, lai skābes līmenis ir tikai nedaudz virs sveķu virsmas, un mazgā kolonnu ar ūdeni, līdz izplūde ir neitrāla pret lakmusu. 50 ml metanola (3.2.) pārnes uz kolonnu un ļauj notecēt līdz sveķu virsmai.

5.4.2. Kolonnas hromatogrāfija.

Ar pipeti uzmanīgi pārnes iegūto ekstraktu (5.3.) uz kolonnu. Izskalo apaļkolbu ar divām 5 līdz 10 ml devām metanola (3.2.) un saskalojumus pārnes uz kolonnu. Nodrošinot, ka plūsmas ātrums nepārsniedz 5 ml minūtē, ekstraktu nolaiž līdz sveķu virsmai, un kolonnu izmazgā ar 50 ml metanola. Izplūdi izmet. Ar 150 ml metānsulfonskābes šķīduma (3.4.) no kolonnas eluē metilbenzokvātu, un kolonnas eluātu savāc koniskā 250 ml kolbā.

5.5. *Divu šķidro fāžu atdalīšana*

Iegūto eluātu (minēts punktā 5.4.2.) pārnes uz 1 litra dalāmo piltuvi. Izskalo konisko kolbu ar 5 līdz 10 ml metanola (3.2.), un saskalojumus apvieno ar dalāmās piltuves saturu. Pievieno 300 ml sālsskābes šķīduma (3.5.) un 130 ml dihlormetāna (3.1.). Krata 1 minūti un ļauj fāzēm atdalīties. Nolaiž apakšējo (dihlormetāna) slāni 500 ml apaļkolbā. Ūdens fāzes ekstrakciju atkārto ar vēl divām 70 ml dihlormetāna devām, un šos ekstraktus apvieno ar pirmo ekstraktu apaļkolbā.

Ar rotācijas ietvaicētāju (4.2.) pazeminātā spiedienā 40 °C temperatūrā ietvaicē dihlormetāna ekstraktu līdz sausam stāvoklim. Atlikumu izšķīdina kolbā, kur ir apmēram 5 ml metanola (3.2.), un šo šķīdumu kvantitatīvi pārnes uz 10 ml mērkolbu. Izskalo apaļkolbu ar vēl divām 1 līdz 2 ml devām metanola, un saskalojumus pārnes uz mērkolbu. Uzpilda līdz zīmei ar metanolu un sajauc. Alikvoto daļu izfiltrē caur membrānas filtru (4.6.). Šo šķīdumu glabā HPLC noteikšanai (5.6.).

5.6. *HPLC noteikšana.*

5.6.1. Parametri

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus, citos apstākļos var strādāt, ja tie dod līdzvērtīgus rezultātus:

— šķidruma hromatogrāfa kolonna (4.4.1.),

— HPLC kustīgā fāze: metanola un ūdens maisījums (3.3.),

— plūsmas ātrums: 1 līdz 1,5 ml/minūtē,

— noteikšanas viļņu garums: 265 nm,

— iešļircināmais tilpums: 20 līdz 50 µl.

Pārbauda hromatogrāfijas sistēmas stabilitāti, vairākas reizes iešpricējot kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3.), kas satur 4 µg/ml līdz sasniedz nemainīgu pīķu augstumu vai laukumu un aiztures laiku.

5.6.2. Kalibrēšanas grafiks.

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.7.3.) iešpricē vairākas reizes, un izmēra katrai koncentrācijai atbilstošos pīķu augstumus (laukumus). Uzzīmē kalibrācijas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu vidējos pīķu augstumus vai laukumus un uz abscisu ass atbilstošās koncentrācijas µg/ml.

5.6.3. Parauga šķīdums.

Iešļircina parauga ekstraktu (5.5.) vairākas reizes, ņemot tādu pašu tilpumu kā kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka metilbenzokvāta pīķu vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana.**

Nosaka parauga šķīduma koncentrāciju µg/ml pēc parauga šķīduma metilbenzokvāta pīķu vidējā augstuma (rajona), salīdzinot ar kalibrēšanas grafiku (5.6.2.).

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

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

kur:

c = metilbenzokvāta koncentrācija parauga šķīdumā lg/ml,

m = testa porcijas masa gramos.

7. **Rezultātu izvērtējums.**

7.1. *Identifikācija.*
Nosakāmā komponenta identitāti var apstiprināt paralēlā hromatogrāfiskā noteikšanā vai lietojot diodu matricas detektoru, ar kura palīdzību salīdzina parauga ekstrakta spektru ar tā kalibrēšanas šķīduma (3.7.3.) spektru, kurš satur 10 µg/ml.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā noteikšana.

Parauga ekstraktu stiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu standartšķīduma (3.7.2.). Pievienotā metilbenzokvāta daudzumam vajadzētu būt līdzīgam parauga ekstraktā aprēķinātajam metilbenzokvāta daudzumam.

Tikai metilbenzokvāta pīķa augstumam būtu jāpalielinās, ņemot vērā pievienoto daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu. Pīķa platumam vietā, kas ir puse no tā maksimālā augstuma, jābūt apmēram 10 % no platuma pīķa apakšā.

7.1.2. Konstatēšana ar diodu matricas detektoru.

Rezultātus vērtē pēc šādiem kritērijiem:

a) parauga maksimālās absorbcijas un standartspektru viļņu garumiem, ko reģistrē pīķa virsotnē hromatogrammā, jābūt vienādiem detektora sistēmas izšķirtspējas noteiktās robežās. Diodu matricas detektoram šīs robežas parasti ir apmēram līdz 2 nm;

b) starp 220 un 350 nm, paraugs un standartspektri hromatogrammā reģistrētajā pīķa virsotnē, nedrīkst atšķirties tajās spektra daļās, kas ir 10 līdz 100 % relatīvās absorbcijas diapazonā. Atbilstība šim kritērijam ir panākta, ja maksimumi sakrīt, un nevienā novērojamā punktā novirze starp abiem spektriem nepārsniedz 15 % no nosakāmā standarta komponenta absorbcijas;

c) starp 220 un 350 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 panākta, ja maksimumi sakrīt un nevienā novērojamā punktā novirze starp spektriem nepārsniedz 15 % no smailes spektra absorbcijas.

Ja nav atbilstības kaut vienam no šiem kritērijiem, nosakāmā komponenta esamība nav apstiprināta.

7.2. *Atkārtojamība.*

Atšķirība starp divu vienam un tam pašam paraugam līdztekus veiktu noteikšanu rezultātiem nedrīkst pārsniegt 10 % no lielākā rezultāta, kur metilbenzokvāta saturs ir starp 4 un 20 mg/kg.

7.3. *Reģenerācija.*

Stiprināta kontrolparauga reģenerācijai vajadzētu būt vismaz 90 %.

8. **Salīdzinošā pētījuma rezultāti.**

10 laboratorijās analizēja piecus paraugus. Katru paraugu analizēja divas reizes.

Rezultāti

	Kontrol paraugs	1. saberztās barības paraugs	1. granulētās barības paraugs	2. saberztās barības paraugs	2. granulētās barības paraugs
vidēji mg/kg	n.a.	4,50	4,50	8,90	8,70
Sr (mg/kg)	–	0,30	0,20	0,60	0,50
CVr (%)	–	6,70	4,40	6,70	5,70
Sr (mg/kg)	–	0,40	0,50	0,90	1,00
CVR (%)	–	8,90	11,10	10,10	11,50
Reģenerācija (%)	–	92,00	93,00	92,00	89,00

n.a. = nav atklāts.
Sr = atkārtojamības vidējā kvadrātiskā novirze.
CVr = atkārtojamības variāciju koeficients.
SR = reproducējamības vidējā kvadrātiskā novirze.
CVR = reproducējamības variāciju koeficients.