

31993L0117

L 329/54

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

1993 12 30

**DVYLIKTOJI KOMISIJOS DIREKTYVA 93/117/EB****1993 m. gruodžio 17 d.****nustatanti valstybinei pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus**

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

2 straipsnis

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 <sup>(1)</sup> su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EEB) Nr. 3768/85 <sup>(2)</sup>, ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi Direktyva 70/373/EEB reikalauja, kad valstybinės institucijos pašarų kontrolę atliktų, taikydamos Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodus, siekiant patikrinti, kaip laikomasi įstatymais, įstatymų lydymaisiais aktais ar administraciniais aktais patvirtintų nuostatų dėl pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų;

kadangi robenidino ir metilbenzokvato priedams nustatyti turi būti sukurti Bendrijos analizės metodai, taikytini tikrinant, ar laikomasi šių priedų panaudojimo gyvulių pašaruose sąlygų;

kadangi priemonės, numatytos šioje direktyvoje, atitinka nuolatinio Pašarų komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

## 1 straipsnis

Valstybės narės reikalauja, kad, oficialiai tikrinant pašarus robenidino ir metilbenzokvato kiekiui juose nustatyti, būtų naudojami šios direktyvos priede nurodyti analizės metodai.

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 1994 m. lapkričio 30 d., įgyvendina šią direktyvą, ir nedelsdamos apie tai praneša Komisijai.

Valstybės narės, tvirtindamos šias priemones, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

## 3 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja trečią dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

Priimta Briuselyje, 1993 m. gruodžio 17 d.

Komisijos vardu

René STEICHEN

Komisijos narys

<sup>(1)</sup> OL L 170, 1970 8 3, p. 2.

<sup>(2)</sup> OL L 362, 1985 12 31, p. 8.

## PRIEDAS

## 1. ROBENIDINO NUSTATYMAS

## 1,3-bis[(4-chlorobenziliden)amino] guanidinas vandenilio chloridas

## 1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas robenidino kiekis pašaruose. Nustatymo riba – 5 mg/kg.

## 2. Metodo esmė

Mėginys ekstrahuojamas parūgštintu metanoliu. Ekstraktas džiovinamas, alikvotinė ekstrakto dalis gryninama aliuminio oksido kolonėlėje. Robenidinas iš kolonėlės išplaunamas metanoliu, koncentruojamas ir judančioje faze praskiedžiamas iki reikiamo tūrio. Robenidino kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviaja skysčių chromatografija (ESCh) su UV detektoriumi.

## 3. Reagentai

## 3.1. Metanolis

## 3.2. Parūgštintas metanolis

4,0 ml druskos rūgšties ( $\rho_{20}^{\circ} = 1,18$  g/ml) įpilama į 500 ml matavimo kolbą, praskiedžiama iki žymės metanoliu (3.1) ir sumaišoma. Tirpalas turi būti ruošiamas iš naujo prieš kiekvieną matavimą.

## 3.3. Acetonitrilas, chromatografiškai grynas

## 3.4. Molekulinis sietas

3A tipo, 8–12 mešų granulės (1,6–2,5 mm rutuliukai, iš kristalinio aliumo-silikato, porų skersmuo 0,3 mm).

## 3.5. Aliuminio oksidas: I laipsnio rūgštinis aktyvumas, skirtas chromatografijai kolonėlėje

100 g aliuminio oksido supilama į tinkamą indą ir įpilama 2,0 ml vandens. Indas užkemšamas ir kratomas maždaug 20 minučių. Laikomas gerai uždarytame inde.

3.6. Kalio-divandenilio fosfato tirpalas,  $c = 0,025$  mol/l

3,40 g kalio-divandenilio fosfato 1 000 ml matavimo kolboje vandenyje (chromatografiškai grynas) ištirpinama 3,4 g kalio-divandenilio fosfato, praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma.

3.7. Dinatrio-vandenilio fosfato tirpalas,  $c = 0,025$  mol/l

1 000 ml matavimo kolboje vandenyje (chromatografiškai grynas) ištirpinama 3,55 g bevandenio dinatrio-vandenilio fosfato (arba 4,45 g dihidrato, arba 8,95 g dodekahidrato), praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma.

## 3.8. ESCh judančioji fazė

Kartu sumaišomi šie reagentai:

650 ml acetonitrilo (3.3),

250 ml vandens (chromatografiškai grynas),

50 ml kalio divandenilio fosfato tirpalo (3.6),

50 ml dinatrio-vandenilio fosfato tirpalo (3.7).

Filtruojama per 0,22  $\mu$ m aktyvumo filtrą (4.6), tirpalas degazuojamas (pavyzdžiui, veikiant 10 minučių ultragarso).

## 3.9. Standartinė medžiaga

Grynas robenidinas: 1,3-bis[(4-chlorobenziliden)amino] guanidinas vandenilio chloridas, E 750.

3.9.1. Robenidino pradinis standartinis tirpalas: 300 µg/ml

0,1 mg tikslumu pasveriami 30 mg robenidino standartinės medžiagos (3.9). 100 ml matavimo kolboje ištirpinama parūgštintame metanolyje (3.2), tuo pačiu tirpikliu praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.2. Robenidino tarpinis standartinis tirpalas: 12 µg/ml

10,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.9.1) įpilama į 250 ml matavimo kolbą, praskiedžiama iki žymės judančioje faze (3.8) ir sumaišoma. Kolba apvyniojama aliuminio folija ir laikoma tamsioje vietoje.

3.9.3. Kalibraciniai tirpalai

Į 50 ml matavimo kolbas įpilama 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ir 25,0 ml tarpinio standartinio tirpalo (3.9.2). Praskiedžiama iki žymės judančioje faze (3.8) ir sumaišoma. Šių tirpalų koncentracija atitinkamai yra 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 ir 6,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

## 4. Įranga

4.1. Stiklinė kolonėlė

Pagaminta iš rudo stiklo su čiaupu ir maždaug 150 ml talpos, vidinis skersmuo 10–15 mm, ilgis 250 mm.

4.2. Šarmyninio veikimo laboratorinė purtyklė

4.3. Sukamasis garintuvas

4.4. ESCh įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu arba diodinės matricos detektoriumi, veikiančiu 250–400 nm bangų ilgio intervale

4.4.1. Skysčių chromatografinė kolonėlė: 300 mm × 4 mm, C18, 10 µm įkrova, arba panaši

4.5. Stiklo pluošto filtro popierius (Whatman GF/A arba panašus)

4.6. Membraniniai 0,22 µm akytumo filtrai

4.7. Membraniniai 0,45 µm akytumo filtrai

## 5. Darbo procedūra

*Pastaba.* Robenidinas yra jautrus šviesai. Visose operacijose turi būti naudojamas rudos spalvos stiklas.

5.1. Bendros nuostatos

5.1.1. Turi būti išanalizuotas „tuščiasis“ pašaras, siekiant patikrinti ar jame nėra robenidino ir nustatymui trukdančių medžiagų.

5.1.2. Turi būti atliekamas išgavos testas, su „tuščiuoju pašaru“ (5.1.1), į jį pridėjus robenidino kiekį, panašų į esantį mėginyje. Siekiant gauti koncentraciją 60 mg/kg, į 250 ml konusinę kolbą įpilama 3,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.9.1). Azoto srovėje tirpalas nugarinamas iki maždaug 0,5 ml. Įdedama 15 g „tuščiojo“ pašaro, sumaišoma ir prieš pradendant ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 minučių.

*Pastaba.* Taikant šį metodą, tuščiajam bandymui naudojamas pašaras turi būti panašus į mėginį, ir jį analizuojant robenidino neturi būti randama.

5.2. Ekstrahavimas

0,01 g tikslumu pasveriami maždaug 15 g paruošto mėginio. Mėginys supilamas į 250 ml konusinę kolbą, į kurią įpilama 100,0 ml parūgštinto metanolio (3.2). Kolba užkemšama ir vieną valandą kratoma ant purtyklės (4.2). Tirpalas filtruojamas per stiklo pluošto filtro popierių (4.5), visas filtratas surenkamas į 150 ml konusinę kolbą. Pridedama 7,5 g molekulinio sieto (3.4), kolba užkemšama ir kratoma penkias minutes. Nedelsiant filtruojama per stiklo pluošto filtro popierių. Toliau tirpalas gryninamas (5.3).

### 5.3. Gryninimas

#### 5.3.1. Aliuminio oksido kolonėlės paruošimas

Į stiklinio vamzdžio (4.1) apačią įkišamas mažas stiklo vatos kamštis, kuris stikline lazdele nustumiamas žemyn. Pasveriam 11,0 g paruošto aliuminio oksido (3.5) ir supilama į kolonėlę. Reikia stengtis, kad pilant kuo mažiau būtų kontaktuojama su oru. Kad aliuminio oksidas susigulėtų, švelniai tapšnoojama per užpildytos kolonėlės apačią.

#### 5.3.2. Mėginio gryninimas

Į kolonėlę pipete įpilama 5,0 ml pagal 5.2 punktą paruošto mėginio ekstrakto. Pipetės galiukas laikomas arti kolonėlės sienelės ir leidžiama, kad tirpalas susigertų į aliuminio oksidą. Robenidinas iš kolonėlės išplaunamas į 250 ml apvaliadugnę kolbą 100 ml metanolio (3.1), nustatant 2–3 ml/min. debitą. Metanolio tirpalas sukamuoju garintuvu (4.3) esant sumažintam slėgiui 40 °C temperatūroje išgarinamas iki sauso likučio. Likutis vėl ištirpinamas 3–4 ml judančiosios fazės (3.8) ir kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Apvaliadugnė kolba kelis kartus plaunama 1–2 ml judančiosios fazės, šiuos praplovimo tirpalus taip pat supilant į matavimo kolbą. Tuo pačiu tirpikliu praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per 0,45 µm filtrą (4.7). Tirpalas naudojamas analizei ESCh metodu (5.4).

### 5.4. Nustatymas ESCh metodu

#### 5.4.1. Parametrai

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

skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1),

ESCh judančioji fazė (3.8),

debitas: 1,5–2,0 ml/min.,

matavimo bangos ilgis: 317 nm,

įleidimo tūris: 20–50 µl.

Patikrinamas chromatografinės sistemos stabilumas, kelis kartus įleidžiant kalibracinio tirpalo (3.9.3), kurio koncentracija 3,6 µg/ml, kol smailės aukštis ir sulaikymo trukmė nesikeis.

#### 5.4.2. Kalibracinė kreivė

Kiekvienas kalibravimo tirpalas (3.9.3) įleidžiamas kelis kartus, kiekvienai koncentracijai išmatuojamas smailės aukštis (plotas). Brėžiama kalibracinė kreivė, ordinačių ašyje atidedant kalibracinių tirpalų smailių aukščių (plotų) vidutines vertes, o atitinkamas koncentracijų vertes µg/ml atidedant abcisių ašyje.

#### 5.4.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus įleidžiamas mėginio ekstraktas (5.3.2), imant toki patį tūrį kaip ir kalibravimo tirpalams, nustatoma vidutinė robenidino smailių aukščio (ploto) vertė.

## 6. Rezultatų apskaičiavimas

Robenidino smailių vidutinio aukščio (ploto) vertes, gautas mėginio tirpalui, lyginant su kalibracinės kreivės duomenimis (5.4.2) nustatoma mėginio tirpalo koncentracija µg/ml.

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

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

čia:

c = robenidino koncentracija mėginio tirpale, µg/ml,

m = matavimui paimtos mėginio dalies masė, g.

## 7. Rezultatų patvirtinimas

### 7.1. Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografijos ar diodinės matricos pagalba, lyginant mėginio ekstrakto ir 6,0 µg/ml kalibracinio tirpalo (3.9.3) spektrus.

## 7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstraktas papildomas kalibravimo tirpalo (3.9.3) atitinkamu kiekiu. Pridedamo robenidino kiekis turi būti panašus į išmatuotą robenidino kiekį mėginio ekstrakto.

Chromatogramoje turi pasikeisti tik robenidino smailės aukštis, atsižvelgiant į pridėtą kiekį ir į praskiedimą. Smailės plotis pusėje jos aukščio turėtų nesiskirti nuo mėginio ekstrakto smailės pločio daugiau kaip 10 %.

## 7.1.2. Detektavimas diodine matrica

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

- 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 diodinės matricos detektoriumi yra maždaug 2 nm;
- tarp 250 ir 400 nm bandinio ir standartinio tirpalo 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;
- tarp 250 ir 400 nm mėginio ekstrakto smailės kylančios dalies, viršūnės ir nusileidžiančios dalies spektrai turi nesiskirti vienas nuo kito tose spektro dalyse, kurios yra 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus patenkinamas, kai, esant tam pačiam absorbcijos maksimumui, visuose stebimuose taškuose nuokrypis tarp spektrų neviršija 15 % smailės viršūnės spektro.

Jei nors vienas šių kriterijų neįvykdomas, analitės buvimas nėra nepatvirtintas.

## 7.2. Pakartojamumas

Kai robenidino kiekis yra didesnis kaip 15 mg/kg, skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti 10 % didesnės rezultato vertės.

## 7.3. Išgava

Atliekant tuščiąjį bandymą su papildytu mėginiu, turi būti randama ne mažiau kaip 85 % pridėto kiekio.

## 8. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

Bendrija suruošė tarplaboratorinį tyrimą, kuriame 12 laboratorijų buvo analizuojami keturi malti ir granuluoti paukščių ir triušių pašarų mėginiai. Kiekvienas mėginys buvo analizuojamas du kartus. Rezultatai pateikiami lentelėje:

	Paukščiai		Triušiai	
	Miltai	Granulės	Miltai	Granulės
Vidutinė vertė, mg/kg	27,0	27,99	43,6	40,1
$S_r$ (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
$CV_r$ (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
$S_R$ (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
$CV_R$ (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Regeneravimas	90,0	93,3	87,2	80,2

$S_r$  = pakartojamumo standartinis nuokrypis,

$CV_r$  = pakartojamumo variacijos koeficientas,

$S_R$  = atkartojamumo standartinis nuokrypis,

$CV_R$  = atkartojamumo variacijos koeficientas.

## 2. METILBENZOKVATO NUSTATYMAS

### 7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-chinolonas

#### 1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas metilbenzokvato kiekis pašaruose. Nustatymo riba - 1 mg/kg.

#### 2. Metodo esmė

Metilbenzokvatas ekstrahuojamas iš mėginio metansulfonrūgšties tirpalu metanolyje. Ekstraktas gryninamas dichlormetanu, taikant jonų mainų chromatografiją, po to vėl dichlormetanu. Metilbenzokvato kiekis nustatomas atvirkštinių fazių efektyviaja skysčių chromatografija (ESCh), naudojant UV detektorių.

#### 3. Reagentai

##### 3.1. Dichlormetanas

##### 3.2. Metanolis chromatografiškai grynas

##### 3.3. ESCh judančioji fazė:

metanolio (3.2) ir vandens (chromatografiškai grynas) mišinys 75: 25 (v: v).

Filtruojama per 0,22 µm aktytumo filtrą (4.5), tirpalas degazuojamas (pavyzdžiui, 10 minučių veikiant ultragarsu).

##### 3.4. Metansulfonrūgšties tirpalas, $c = 2\%$

20,0 ml metansulfonrūgšties praskiedžiama iki 1 000 ml metanolio (3.2).

##### 3.5. Druskos rūgšties tirpalas, $c = 10\%$

100 ml druskos rūgšties ( $\rho_{20}^{\circ} = 1,18$  g/ml) praskiedžiama iki 1 000 ml vandeniu.

##### 3.6. Katijonų mainų derva Amberlite CG-120 (Na), 100–200 mešų

Prieš naudojimą derva apdorojama: paruošiama 100 g dervos ir 500 ml druskos rūgšties tirpalo (3.5) suspensija, kuri ant elektrinės pletelės pakaitinama nuolat maišant iki virimo. Paliekama ataušti, po to rūgštis dekantuojama. Rūgštis likutis per filtro popierių nusiurbiamas vakuuminio siurbliu. Derva du kartus plaunama 500 ml vandens ir po to 250 ml metanolio (3.2). Derva skalaujama dar 250 ml metanolio ir džiovinama per dervos sluoksnį ant filtro siurbiant orą. Išdžiovinta derva laikoma užkimštame butelyje.

##### 3.7. Etaloninė medžiaga: grynas metilbenzokvatas: 7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-chinolonas

###### 3.7.1. Metilbenzokvato pradinis standartinis tirpalas: 500 µg/ml

0,1 mg tikslumu pasveriama 50 mg standartinės medžiagos (3.7), 100 ml matavimo kolboje ištirpinama metansulfonrūgšties tirpale (3.4), praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma.

###### 3.7.2. Metilbenzokvato tarpinis standartinis tirpalas: 50 µg/ml

5,0 ml pradinio standartinio tirpalo (3.7.1) įpilama į 50 ml matavimo kolbą, praskiedžiama iki žymės metanolio (3.2) ir sumaišoma.

###### 3.7.3. Kalibraciniai tirpalai

Į 25 ml matavimo kolbas įpilama 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ir 5,0 ml tarpinio standartinio metilbenzokvato etaloninio tirpalo (3.7.2). Praskiedžiama iki žymės judančiąja faze (3.3) ir sumaišoma. Šių tirpalų metilbenzokvato koncentracija atitinkamai yra 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ir 10,0 µg/ml. Šie tirpalai turi būti ruošiami prieš pat naudojimą.

#### 4. Įranga

##### 4.1. Laboratorinė purtyklė

- 4.2. Sukamasis garintuvas
- 4.3. Stiklinė kolonėlė (250 mm × 15 mm), turinti čiampa ir maždaug 200 ml talpos
- 4.4. ESCh įranga su kintamo bangos ilgio ultravioletiniu arba diodinės matricos detektoriumi
- 4.4.1. Kolonėlė skysčių chromatografijai: 300 mm × 4 mm, užpildas C-18 arba atitinkamas, dalelių dydis 10 µm.
- 4.5. Membraniniai 0,22 µm akytumo filtrai
- 4.5. Membraniniai 0,45 µm akytumo filtrai

## 5. Darbo procedūra

- 5.1. Bendros nuostatos
- 5.1.1. Turi būti išanalizuotas tuščiasis mėginys siekiant patikrinti, ar jame nėra metilbenzokvato ir nustatymui trukdančių medžiagų.
- 5.1.2. Turi būti atliekamas išgavos testas, pridėjus į „tuščiąjį“ pašarą metilbenzokvato kiekį, panašų į esantį mėginyje. Siekiant koncentraciją padidinti iki 15 mg/kg, į 20 g tuščiajam bandymui skirto pašaro įpilama 600 µl pradinio standartinio tirpalo (3.7.1), sumaišoma ir prieš pradedant ekstrahavimą (5.2) palaukiama 10 minučių.

*Pastaba.* Taikant šį metodą, tuščiajam bandymui naudojamas pašaras turi būti panašus į mėginį, ir jį analizuojant metilbenzokvato neturi būti randama.

### 5.2. Ekstrahavimas

0,01 g tikslumu pasveriamas maždaug 20 g paruošto mėginio. Mėginys supilamas į 250 ml konusinę kolbą, į kurią įpilama 100,0 ml metansulfonrūgšties tirpalo (3.4) ir kolba 30 minučių mechaniškai kratoma ant purtyklės (4.1). Tirpalas filtruojamas per filtro popierių, filtratas naudojamas skystų fazių perskyrimui (5.3).

### 5.3. Skysčių fazių perskyrimas

Į 500 ml talpos dalomąjį piltuvą, kuriame yra 100 ml druskos rūgšties tirpalo (3.5), įpilama 25,0 ml pagal 5.2 punktą gauto filtrato. Į piltuvą įpilama 100 ml dichlormetano (3.1) ir purtoma vieną minutę. Sluoksniams leidžiama atsiskirti ir apatinis (dichlormetaninis) sluoksnis išleidžiamas į apvaliadugnę 500 ml tūrio kolbą. Vandeninio sluoksnio ekstrahavimas pakartojamas su dviem papildomomis 40 ml dichlormetano porcijomis, šie ekstraktai supilami kartu su pirmuoju ekstraktu į tą pačią apvaliadugnę kolbą. Sukamajame garintuve (4.2), esant sumažintam slėgiui, dichlormetaninis ekstraktas 40 °C temperatūroje nugarinamas iki sauso likučio. Likutis kolboje ištirpinamas 20–25 ml metanolio (3.2), kolba užkemšama, šis visas ekstraktas paliekamas chromatografavimui jonų mainų metodu (5.4).

### 5.4. Jonų mainų chromatografija

#### 5.4.1. Katijonų mainų kolonėlės paruošimas

Į stiklinio vamzdžio (4.3) apačią įkišamas mažas stiklo vatos kamštis. Paruošiama 5,0 g apdoroto katijonito (3.6) ir 50 ml druskos rūgšties (3.5) suspensija, kuri supilama į stiklinę kolonėlę, čia dervai leidžiama nusėsti. Rūgšties perteklius išleidžiamas, kad likusi vos apsemtų dervos sluoksnį, kolonėlė plaunama vandeniu, kol plovimo vanduo tampa neutralus pagal lakmusą. Į kolonėlę įpilama 50 ml metanolio (3.2), kuris išleidžiamas iki dervos sluoksnio viršaus.

#### 5.4.2. Chromatografavimas kolonėlėje

Atsargiai pipete į kolonėlę įpilamas pagal 5.3 punktą gautas ekstraktas. Apvaliadugnė kolba skalaujama dviem 5–10 ml metanolio (3.2) porcijomis, šie praplovimo skysčiai irgi supilami į kolonėlę. Ekstraktas nuleidžiamas iki dervos viršaus, kolonėlė plaunama 50 ml metanolio, užtikrinant, kad debitas neviršytų 5 ml per minutę. Ištekęs skystis išpilamas. Metilbenzokvatas iš kolonėlės išplaunamas 150 ml metansulfonrūgšties tirpalo (3.4), eliuatas surenkamas į 250 ml tūrio konusinę kolbą.

### 5.5. Skystų fazių perskyrimas

Pagal 5.4.2 punktą gautas eliuatas supilamas į 1 l talpos dalomąjį piltuvą. Konusinė kolba praplaunama 5–10 ml metanolio (3.2), praplovimo tirpalas sujungiamas su dalomojo piltuvo turiniu. Įpilama 300 ml druskos rūgšties tirpalo (3.5) ir 130 ml dichlormetano (3.1). Purinama 1 minutę, fazėms leidžiama atsiskirti. Apatinis (dichlormetaninis) sluoksnis išleidžiamas į 500 ml apvaliadugnę kolbą. Vandeninio sluoksnio ekstrahavimas pakartojamas su dviem papildomomis 70 ml dichlormetano porcijomis, šie ekstraktai supilami kartu su pirmuoju į tą pačią apvaliadugnę kolbą.

Sukamajame garintuve (4.2), esant sumažintam slėgiui, dichlormetaninis ekstraktas 40 °C temperatūroje išgarinamas iki sauso likučio. Likutis kolboje ištirpinamas maždaug 5 ml metanolio (3.2) ir gautas tirpalas kiekybiškai supilamas į 10 ml matavimo kolbą. Apvaliadugnė kolba skalaujama dar dviem 1–2 ml metanolio porcijomis, plovimo skyčiai supilami į tą pačią matavimo kolbą. Metanoliumi praskiedžiama iki žymės ir sumaišoma. Alikvotinė tirpalo dalis filtruojama per membraninį filtrą (4.6). Šis tirpalas paliekamas nustatymui ESCh metodu (5.6).

### 5.6. Nustatymas ESCh metodu

#### 5.6.1. Parametrai

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

- skysčių chromatografijos kolonėlė (4.4.1),
- ESCh judančioji fazė: metanolio ir vandens mišinys (3.3),
- debitas: 1,0–1,5 ml/min.,
- matavimo bangos ilgis: 265 nm,
- įleidžiamas tūris: 20–50 µl.

Patikrinamas chromatografinės sistemos stabilumas, kelis kartus įleidžiant kalibracinio tirpalo (3.7.3), kurio koncentracija 4,0 µg/ml, kol bus gautas pastovus smailės aukštis ir sulaiikymo trukmė.

#### 5.6.2. Kalibracinė kreivė

Kiekvienas kalibracinis tirpalas (3.7.3) įleidžiamas kelis kartus, išmatuojamas kiekvienai koncentracijai smailės aukštis (plotas). Brėžiama kalibracinė kreivė, ordinačių ašyje atidedant kalibracinių tirpalų smailių aukščių (plotų) vidutines vertes, abscisėje – atitinkamas koncentracijų vertes, µg/ml.

#### 5.6.3. Mėginio tirpalas

Kelis kartus įleidžiamas mėginio ekstraktas (5.5), naudojant tokį patį tūrį kaip ir kalibracinių tirpalų. Nustatoma vidutinė metilbenzokvato smailių aukščio (ploto) vertė.

## 6. Rezultatų apskaičiavimas

Metilbenzokvato smailių aukščio (ploto) vidutines vertes, gautas mėginio tirpalui, lyginant su kalibracinės kreivės duomenimis (5.6.2), nustatoma mėginio tirpalo koncentracija µg/ml.

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

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

čia:

*c* = metilbenzokvato koncentracija mėginio tirpale, µg/ml,

*m* = matavimui paimtos mėginio dalies masė, g.

## 7. Rezultatų patvirtinimas

### 7.1. Tapatumas

Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografija ar diodine matrica, lyginant mėginio ekstrakto ir 10,0 µg/ml kalibracinio tirpalo (3.7.3) spektrus.



## 7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstraktas papildomas atitinkamu kiekiu tarpinio standartinio tirpalo (3.7.2). Pridedamo metilbenzokvato kiekis turi būti panašus į mėginio ekstrakto nustatyto metilbenzokvato kiekį.

Chromatogramoje turi padidėti tik metilbenzokvato smailės aukštis, atsižvelgiant į pridėtą kiekį ir į ekstrakto prasidėjimą. Smailės plotis pusėje jos aukščio turi nesiskirti nuo mėginio ekstrakto smailės pločio daugiau kaip 10 %.

## 7.1.2. Detektavimas diodine matrica

Rezultatai vertinami pagal šiuos kriterijus:

- mėginio ir standartinio tirpalo spektrų absorbcijos maksimumų bangų ilgiai, užregistruoti chromatogramų smailės viršūnėje, turi būti vienodi ir paklaida neturi viršyti detekcinės sistemos skiriamosios gebos sąlygojamų ribų. Šios ribos diodinės matricos detektoriumi yra maždaug 2 nm;
- tarp 220 ir 350 nm mėginio ir standartinio tirpalo chromatogramų smailių viršūnių spektrai neturi skirtis, kai santykinė absorbcija yra 10–100 %. Šis kriterijus patenkinamas, kai, esant tam pačiam absorbcijos maksimumui, nėra nei vieno taško, kuriame nuokrypis tarp dviejų spektrų viršūčių 15 % standarto analizės absorbcijos;
- tarp 220 ir 350 nm mėginio ekstrakto smailės kylancios dalies, viršūnės ir nusileidžiančios dalies spektrai turi nesiskirti vienas nuo kito tose spektro dalyse, kurios yra 10–100 % santykinio optinio tankio intervale. Šis kriterijus patenkinamas, kai, esant tam pačiam absorbcijos maksimumui, visuose stebimuose taškuose nuokrypis tarp spektrų neviršija 15 % smailės viršūnės spektro absorbcijos.

Jei nors vienas šių kriterijų neįvykdomas, analizės buvimas nėra patvirtintas.

## 7.2. Pakartojamumas

Skirtumas tarp dviejų rezultatų, gautų atliekant du lygiagrečius matavimus su tuo pačiu mėginiu, turi neviršyti: 10 % santykinai didesnės vertės, kai metilbenzokvato kiekis yra 4–20 mg/kg.

## 7.3. Išgava

Atliekant tuščiąjį bandymą su papildytu mėginiu, turi būti randama ne mažiau kaip 90 % pridėto kiekio.

## 8. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

10 laboratorijų buvo analizuojami 5 mėginiai. Kiekvienas mėginys buvo analizuojamas du kartus.

**Rezultatai**

	Tuščiasis mėginys	Miltai 1	Granulės 1	Miltai 2	Granulės 2
Vidutinė vertė, mg/kg	nerasta	4,50	4,50	8,90	8,70
$S_f$ (mg/kg)	–	0,30	0,20	0,60	0,50
$CV_f$ (%)	–	6,70	4,40	6,70	5,70
$S_R$ (mg/kg)	–	0,40	0,50	0,90	1,00
$CV_R$ (%)	–	8,90	11,10	10,10	11,50
Regeneravimas	–	92,00	93,00	92,00	89,00

$S_f$  = pakartojamumo standartinis nuokrypis,

$CV_f$  = pakartojamumo variacijos koeficientas,

$S_R$  = atkartojamumo standartinis nuokrypis,

$CV_R$  = atkartojamumo variacijos koeficientas.