393L0070

17.9.93 EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI N:o L 234/17

YHDESTOISTA KOMISSION DIREKTIIVI 93/70/ETY,

annettu 28 päivänä heinäkuuta 1993,

yhteisön määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY(1), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) 3768/85(2), ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivissä 70/373/ETY säädetään rehujen virallisen tarkastuksen suorittamisesta yhteisön näytteenotto-ja määritysmenetelmiä käyttäen sen todentamiseksi, että lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten rehujen laatua ja koostumusta koskevat vaatimukset tulevat täytetyksi,

halofuginonin käyttöä rehuissa koskevien edellytysten täyttämisen valvomiseksi on tarpeen säätää yhteisön tasolla kyseessä olevan lisäaineen määritysmenetelmästä, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on määrättävä, että rehujen virallisessa tarkastuksessa käytettävät halofuginonipitoisuuden määritykset suoritetaan liitteessä esitetyn menetelmän mukaisesti.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 30 päivänä kesäkuuta 1994. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin, tai niitä virallisesti julkaistaessa niihin on liitettävä viittaus tähän direktiiviin. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

3 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 28 päivänä heinäkuuta 1993.

Komission puolesta

René STEICHEN

Komission jäsen

(1) EYVL N:o L 170, 3.8.1970, s. 2
(2) EYVL N:o L 362, 31.12.1985, s. 8

LIITE

HALOFUGINONIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[(3-(3-hydroksi-2-piperidyyli)asetonyyli]-kinatsolin-4-(3H)-onihydrobromidi

1 **Tarkoitus ja soveltamisala**

Tällä menetelmällä määritetään halofuginonipitoisuus rehuissa. Määrityksen alaraja on 1 mg/kg.

2 **Periaate**

Halofuginoni käsitellään kuumalla vedellä ja uutetaan tämän jälkeen vapaana emäksenä etyyliasetaattiin ja erotetaan hydrokloridina happamaan vesiliuokseen. Uute puhdistetaan ioninvaihtokromatografialla. Halofuginonipitoisuus määritetään käänteisfaasissa suuren erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC) UV-detektoria käyttäen.

3 **Reagenssit**

3.1 Asetonitriili, HPLC-laatua

3.2 Amberlite XAD-2 -hartsi

3.3 Ammoniumasetaatti

3.4 Etyyliasetaatti

3.5 Etikkahappo

3.6 Halofuginonistandardi (DL-trans-7-bromi-6-kloori-3-[(3-(3-hydroksi-2-piperidyyli)asetonyyli]-kinatsolin-4-(3H)-onihydrobromidi, E 764)

3.6.1 Standardikantaliuos, 100 µg/ml

Mitataan 500 ml:n mittapulloon 50 mg (0,1 mg:n tarkkuudella) halofuginonia (3.6), liuotetaan ammoniumasetaattipuskuriliuokseen (3.18), täytetään merkkiin puskuriliuoksella ja sekoitetaan. Tämä liuos säilyy 5 °C:ssa kolmen viikon ajan, jos sitä säilytetään valolta suojattuna.

3.6.2 Kalibrointiliuokset

Mitataan sarjaan 100 ml:n mittapulloja 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 6,0 ml standardikantaliuosta (3.6.1). Täytetään merkkiin liikkuvalla faasilla (3.21) ja sekoitetaan. Näiden liuosten halofuginonipitoisuudet ovat 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ja 6,0 µg/ml. Liuokset on valmistettava juuri ennen käyttöä.

3.7 Vetykloridihappo (ϱ_{20} noin 1,16 g/ml)

3.8 Metanoli

3.9 Hopeanitraatti

3.10 Natriumaskorbaatti

3.11 Natriumkarbonaatti

3.12 Natriumkloridi

3.13 EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo, dinatriumsuola)

3.14 Vesi, HPLC-laatua

3.15 Natriumkarbonaattiliuos, ϑ = 10 g/100 ml

3.1.6 Natriumkloridi-kylläinen natriumkarbonaattiliuos, ϑ = 5 g/100 ml

Liuotetaan 50 g natriumkarbonaattia (3.11) veteen, täytetään 1 l:ksi ja lisätään natriumkloridia (3.12), kunnes liuos on kylläinen.

3.17 Vetykloridihappo, noin 0,1 mol/l

Laimennetaan 10 ml vetykloridihappoa (3.7) vedellä 1 l:ksi.

3.18 Ammoniumasetaattipuskuriliuos, noin 0,25 mol/l

Liuotetaan 19,3 g ammoniumasetaattia (3.3) ja 30 ml etikkahappoa (3.5) veteen (3.14) ja täytetään 1 l:ksi.

3.19 Amberlite XAD-2 -hartsin esikäsittely

Pestään sopivaa määrää Amberlitea (3.2) vedellä, kunnes pesuun käytetyssä vesifaasissa hopeanitraatilla (3.20) tehtävä koe osoittaa, että kloridi-ioneita ei enää ole. Tämän jälkeen hartsi pestään 50 ml metanolia (3.8), tämä metanoli heitetään pois ja hartsia säilytetään tuoreessa metanolissa.

3.20 Hopeanitraattiliuos, noin 0,1 mol/l

Liuotetaan 0,17 g hopeanitraattia (3.9) 10 ml:aan vettä.

3.21 HPLC:n liikkuva faasi

Sekoitetaan 500 ml asetonitriiliä (3.1) 300 ml:aan ammoniumasetaattipuskuriliuosta (3.18) ja 1 200 ml:aan vettä (3.14). Säädetään pH arvoon 4,3 etikkahapolla (3.5). Suodatetaan 0,22 µm:n suodattimen (4.8) läpi ja poistetaan kaasut liuoksesta (esimerkiksi 10 minuutin ultraäänikäsittelyllä). Tämä liuos säilyy yhden kuukauden ajan, jos sitä säilytetään suljetussa astiassa valolta suojattuna.

4 **Välineistö**

4.1 Ultraäänikammio

4.2 Pyöröhaihdutin

4.3 Sentrifugi

4.4 HPLC-välineistö, johon kuuluu eri aallonpituuksilla käytettävä UV-detektori tai diodisarjadetektori

4.4.1 Nestekromatografiakolonni, 300 mm x 4 mm, joka on täytetty 10 µm:n C 18-tyyppisillä hiukkasilla tai vastaava kolonni

4.5 Lasikolonni (300 mm x 10 mm), joka on varustettu lasisintterisuodattimella ja hanalla

4.6 Lasikuitusuodattimia, halkaisija 150 mm

4.7 Kalvosuodattimia, 0,45 µm

4.8 Kalvosuodattimia, 0,22 µm

5 **Suoritus**

Huomautus: Vapaana emäksenä halofuginoni on pysymätön alkalisissa liuoksissa ja etyyliasetaattiliuoksissa. Se ei saisi olla etyyliasetaatissa yli 30 minuuttia.

5.1 Yleistä

5.1.1 Rikastamaton rehu (nollarehu) olisi määritettävä sen varmistamiseksi, että se ei sisällä halofuginonia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Määritettäessä nollarehua, johon on lisätty näytteessä olevaa määrää vastaava määrä halofuginonia, on tehtävä saantokoe. Pitoisuuden 3 mg/kg aikaan saamiseksi lisätään 300 µl standardikantaliuosta (3.6.1) 10 g:aan nollarehua, sekoitetaan ja annetaan seistä 10 minuuttia ennen uuttamista (5.2).

Huomautus: tätä menetelmää käytettäessä nollarehun on vastattava koostumukseltaan näytettä ja halofuginonia ei saa havaita määrityksessä.

5.2 Uuttaminen

Punnitaan 0,01 g:n tarkkuudella 10 g valmistettua näytettä 200 ml:n sentrifugiputkeen, lisätään 0,5 g natriumaskorbaattia (3.10), 0,5 g EDTA:a (3.13) ja 20 ml vettä. Sekoitetaan. Asetetaan putki vesihauteeseen (80 °C) 5 minuutiksi. Annetaan jäähtyä huoneen lämpötilaan, jonka jälkeen lisätään 20 ml natriumkarbonaattiliuosta (3.15) ja sekoitetaan. Lisätään viipymättä 100 ml etyyliasetaattia (3.4) ja ravistellaan käsin voimakkaasti 15 sekunnin ajan. Tämän jälkeen putki sijoitetaan kolmeksi minuutiksi ultraäänikammioon (4.1) ja korkkia höllennetään. Sentrifugoidaan 2 minuuttia ja dekantoidaan etyyliasetaattifaasi lasikuitusuodattimen (4.6) läpi 500 ml:n erotussuppiloon. Toistetaan näytteen uutto toisella 100 ml:n etyyliasetaattiannoksella. Pestään yhdistettyjä uutteita 1 minuutin ajan 50 ml:lla natriumkloridi-kylläistä natriumkarbonaattiliuosta (3.16) ja poistetaan vesifaasi.

Uutetaan orgaanista kerrosta 50 ml:lla vetykloridihappoa (3.17) 1 minuutin ajan. Juoksutetaan alempi happokerros 250 ml:n erotussuppiloon. Uutetaan orgaanista kerrosta vielä 50 ml:lla vetykloridihappoa 1,5 minuutin ajan ja yhdistetään uutteet. Pestään yhdistetyt happouutteet ravistelemalla niitä noin 10 sekunnin ajan 10 ml:ssa etyyliasetaattia (3.4).

Siirretään vesikerros kvantitatiivisesti 250 ml:n pyörökolviin ja heitetään orgaaninen faasi pois. Haihdutetaan pyöröhaihduttajalla (4.2) kaikki etyyliasetaattijäämät happoliuoksesta. Vesihauteen lämpötila ei saisi olla yli 40 °C. Noin 25 mbar:n tyhjössä etyyliasetaattijäämät häviävät 5 minuutissa 38 °C:ssa.

5.3 Puhdistaminen

5.3.1 Amberlite-kolonnin valmistaminen

Kullekin näyteuutteelle valmistetaan XAD-2 -kolonni. Siirretään metanolilla (3.8) 10 g esikäsiteltyä Amberlitea (3.19) lasikolonniin (4.5). Lisätään pieni lasivillatuppo hartsikerroksen päälle. Juoksutetaan metanoli kolonnista ja pestään hartsi 100 ml:lla vettä ja pysäytetään virtaus, kun neste yltää hartsikerroksen yläosaan. Annetaan kolonnin stabiloitua 10 minuuttia ennen sen käyttöä. Kolonnin ei saa koskaan antaa kuivua.

5.3.2 Näytteen puhdistaminen

Siirretään uute (5.2) kvantitatiivisesti valmistetun Amberlite-kolonnin (5.3.1) yläosaan, eluoidaan ja heitetään eluaatti pois. Eluointinopeus ei saa olla yli 20 ml minuutissa. Huuhdellaan pyörökolvi 20 ml:lla vetykloridihappoa (3.17) ja käytetään tätä liuosta hartsikolonnin pesemiseen. Poistetaan happoliuosjäämä ilmavirralla. Heitetään pesuliuokset pois. Lisätään kolonniin 100 ml metanolia (3.8) ja annetaan eluoitua 5 - 10 ml ja kerätään eluaatti 250 ml:n pyörökolviin. Annetaan jäljelle jääneen metanolin stabiloitua hartsin kanssa 10 minuutin ajan, jatketaan eluointia alle 20 ml minuutissa olevalla nopeudella ja kerätään eluaatti samaan pyörökolviin. Haihdutetaan metanoli pyöröhaihduttimella (4.2) huolehtien siitä, että vesihauteen lämpötila ei ole yli 40 °C. Siirretään jäännös kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon käyttäen liikkuvaa faasia (3.21). Täytetään merkkiin liikkuvalla faasilla ja sekoitetaan. Suodatetaan näyte kalvosuodattimen (4.7) läpi. Säilytetään tämä liuos HPLC-määritystä (5.4) varten.

5.4 HPLC-määritys

5.4.1 Muuttujat

Seuraavat edellytykset ovat ohjeellisia. Muita muuttujia voidaan käyttää sillä edellytyksellä, että niillä saadaan vastaavat tulokset.

Nestekromatografiakolonni (4.4.1)

HPLC:n liikkuva faasi (3.21)

Virtausnopeus: 1,5 - 2 ml/min

Määritysaallonpituus: 243 nm

Injektoitu määrä: 40 - 100 µl

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus on tarkastettava injektoimalla 3,0 µg/ml:n kalibrointiliuosta (3.6.2) useita kertoja, kunnes piikkien korkeudet (pinta-alat) ja retentioajat eivät muutu.

5.4.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan jokaista kalibrointiliuosta (3.6.2) useita kertoja ja mitataan piikkien korkeudet (pinta-alat) jokaiselle pitoisuudelle. Piirretään kalibrointikäyrä käyttäen ordinaattana kalibrointiliuosten piikkien korkeuksien tai pinta-alojen keskiarvoja ja abskissana vastaavia pitoisuuksia ilmaistuna µg/ml.

5.4.3 Näyteliuos

Injektoidaan useita kertoja näyteuutetta (5.3.2) käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuoksille ja määritetään halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvo.

6 **Tulosten laskeminen**

Määritetään näyteliuoksen pitoisuus ilmaistuna µg/ml näyteliuoksen halofuginonin piikkien korkeuden (pinta-alan) keskiarvosta kalibrointikäyrän (5.4.2) avulla.

Näytteessä olevan halofuginonin määrä w (mg/kg) lasketaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa:

— c: näyteliuoksen halofuginonipitoisuus, µg/ml

— m: näytteen massa, grammoina

7 **Tulosten vahvistaminen**

7.1 Tunnistus

Tutkittavan aineen tunnistaminen on vahvistettava rinnakkaiskromatografialla tai käyttämällä diodisarjadetektoria, jolla voidaan verrata näyteuutteen ja halofuginonia 6,0 µg/ml sisältävän kalibrointiliuoksen (3.6.2) spektrejä.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näyteuutetta vahvistetaan lisäämällä siihen sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.6.2). Lisätyn halofuginonimäärän on vastattava näyteuutteesta todetun halofuginonin arvioitua määrää.

Otettaessa huomioon samanaikaisesti lisätty määrä ja uutteen laimeneminen vain halofuginonin piikin korkeuden olisi kasvettava. Piikin puolivälissä sen leveyden tulee olla ± 10 % lähtöleveydestä.

7.1.2 Diodisarjamääritys

Tulokset arvioidaan seuraavin perustein:

a) näytteen ja standardin spektrien maksimiabsorption aallonpituuden, joka on rekisteröity kromatogrammin piikkien kärjessä, on oltava sama määritysjärjestelmän erotuskyvyn mukaan määritetyissä rajoissa. Diodisarjamäärityksessä se on yleensä noin 2 nm;

b) välillä 225–300 nm näytteen ja standardin spektrit, jotka on rekisteröity kromatogrammin piikkien kärjessä, eivät saa erota toisistaan niissä spektrin osissa, jotka ovat välillä 10–100 % suhteellisesta absorbanssista. Tämä peruste täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden kahden spektrin välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 % standardina olevan tutkittavan aineen absorbanssista;

c) välillä 225–300 nm näyteuutteen antaman piikin nousevan osan, kärjen ja laskevan osan spektrit eivät silmämääräisesti tarkasteltuna saa erota toisistaan niissä spektrin osissa, jotka ovat välillä 10–100 % suhteellisesta absorbanssista. Tämä peruste täyttyy, kun maksimit ovat samat ja näiden spektrien välillä havaittu poikkeama ei ole missään kohdassa yli 15 % piikin kärjen spektrin absorbanssista.

Jos jokin näistä perusteista ei täyty, tutkittavan aineen esiintymistä ei ole vahvistettu.

7.2 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaismäärityksen tulosten välinen ero ei saa olla yli 0,5 mg/kg, kun halofuginonipitoisuudet ovat enintään 3 mg/kg.

7.3 Saanto

Vahvistetun nollanäytteen saannon on oltava vähintään 80 %.

8 **Laboratorioiden välisen tutkimuksen tulokset**

Laboratorioiden välisessä tutkimuksessa(1) kahdeksan laboratorioita määritti kolme näytettä.

Tulokset

	Näyte A (nollanäyte) vastaanotettaessa	Näyte B (jauhona)		Näyte C (rakeina)	
		vastaan-otettaessa	2 kuukauden jälkeen	vastaan-otettaessa	2 kuukauden jälkeen
Keskiarvo(1)	ei hav.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	-	16	18	14	17
saanto		86	74	88	75

(1) yksiköt: mg/kg
ei hav: ei havaittu
S_R: toistettavuuden standardipoikkeama
CV_R: variaatiokerroin (%)
saanto: saanto (%)

(1) *The Analyst* 108, 1983, s. 1252–1256