31993L0070

ÜHETEISTKÜMNES KOMISJONI DIREKTIIV 93/70/EMÜ,

28. juuli 1993,

millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid sööda ametlikuks kontrollimiseks

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi nr 70/373/EMÜ söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta, [1] viimati muudetud määrusega (EMÜ) nr 3768/85, [2] eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

direktiivis 70/373/EMÜ nõutakse, et söötade ametlik kontrollimine söötade kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigusnormide nõuetele vastavuse kindlakstegemiseks peab toimuma ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;

söödalisand halofuginooni jaoks tuleks kehtestada ühenduse analüüsimeetod, et kontrollida kõnealuse söödalisandi loomasöödas kasutamist käsitlevate tingimuste järgimist;

käesoleva direktiiviga ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid nõuavad, et analüüsid söötade halofuginoonisisalduse ametlikuks kontrollimiseks tehakse vastavalt käesoleva direktiivi lisas kirjeldatud meetodile.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi täitmiseks vajalikud õigusnormid 30. juuniks 1994. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Kui liikmesriigid kõnealused normid vastu võtavad, lisavad nad nendesse või nende ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Sellise viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 28. juuli 1993

Komisjoni nimel

komisjoni liige

René STEICHEN

[1] EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.
[2] EÜT L 362, 31.12.1985, lk 8.

LISA

HALOFUGINOONI MÄÄRAMINE

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hüdroksü-2-piperidüül)atsetonüül]-kinasoliin-4-(3H)-üks hüdrobromiid

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Käesolev meetod on halofuginooni määramiseks söötades. Alumine määramispiir on 1 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Halofuginoon töödeldakse sooja veega, ekstraheeritakse vaba alusena etüülatsetaati ning eraldatakse hüdrokloriidina happe vesilahusesse. Ekstrakt puhastatakse ioonivahetuskromatograafia abil. Halofuginoonisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

3.1. Atsetonitriil, puhas HPLC jaoks

3.2. Amberlite XAD-2 vaik

3.3. Ammooniumatsetaat

3.4. Etüülatsetaat

3.5. Jää-äädikhape

3.6. Halofuginooni standardaine (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hüdroksü-2-piperidüül)atsetonüül]-kinasoliin-4-(3H)-üks hüdrobromiid, E 764)

3.6.1. Halofuginooni põhistandardlahus, 100 µg/ml

50 mg halofuginooni (3.6) kaalutakse 0,1 mg täpsusega 500 ml mõõtekolbi, lahustatakse ammooniumatsetaadi puhverlahuses (3.18), täiendatakse kuni märgini puhverlahusega ja segatakse. See lahus säilib pimedas 5 °C juures kolm nädalat.

3.6.2. Kaliibrimislahused

100 ml mõõtekolbidesse kantakse 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 6,0 ml põhistandardlahust (3.6.1). Täiendatakse kuni märgini liikuva faasiga (3.21) ja segatakse. Nende lahuste halofuginoonikontsentratsioonid on vastavalt 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 6,0 µg/ml. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.7. Soolhape (tihedus 20 °C juures umbes 1,16 g/ml)

3.8. Metanool

3.9. Hõbenitraat

3.10. Naatriumaskorbaat

3.11. Naatriumkarbonaat

3.12. Naatriumkloriid

3.13. EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape, dinaatriumsool)

3.14. Vesi, puhas HPLC jaoks

3.15. Naatriumkarbonaadi lahus, β = 10 g/100 ml

3.16. Naatriumkloriidiga küllastatud naatriumkarbonaadi lahus, β = 5 g/100 ml

50 g naatriumkarbonaati (3.11) lahustatakse vees, lahjendatakse 1 liitrini ja lisatakse kuni lahuse küllastumiseni naatriumkloriidi (3.12).

3.17. Soolhape, umbes 0,1 mol/l

10 ml soolhapet (3.7) lahjendatakse kuni 1 liitrini veega.

3.18. Ammooniumatsetaadi puhverlahus, umbes 0,25

19,3 g ammooniumatsetaati (3.3) ja 30 ml äädikhapet (3.5) lahustatakse vees (3.14) ja lahjendatakse kuni 1 liitrini.

3.19. Amberlite XAD-2 vaigu ettevalmistamine

Asjakohast kogust Amberlite'i (3.2) pestakse veega, kuni äravalatud vesifaasile tehtud hõbenitraadi (3.20) test näitab, et kõik klooriioonid on eemaldatud. Vaiku pestakse 50 ml metanooliga (3.8), metanool valatakse ära ja vaik säilitatakse värskes metanoolis.

3.20. Hõbenitraadi lahus, umbes 0,1 mol/l

0,17 g hõbenitraati (3.9) lahustatakse 10 ml vees.

3.21. **HPLC liikuv faas**

500 ml atsetonitriili (3.1) segatakse 300 ml ammooniumatsetaadi puhverlahusega (3.18) ja 1 200 ml veega (3.14). Äädikhappe (3.5) abil reguleeritakse pH 4,3-le. Filtreeritakse läbi 0,22 µm filtri (4.8) ja lahus degaseeritakse (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit). See lahus säilib suletud mahutis pimedas hoituna üks kuu.

4. **Seadmed**

4.1. Ultrahelivann.

4.2. Filter-pöördaurusti

4.3. Tsentrifuug

4.4. HPLC-seade muudetava lainepikkusega ultraviolett-detektoriga või dioodireadetektoriga

4.4.1. Vedelikkromatograafi kolonn, 300 mm × 4 mm, täidetud 10 µm suuruste C 18 tüüpi osakestega, või analoogne kolonn

4.5. Klaaskolonn (300 mm × 10 mm), millel on paagutatud klaasfilter ja korkkraan

4.6. Klaaskiudfiltrid diameetriga 150 mm

4.7. Membraanfiltrid, 0,45 µm

4.8. Membraanfiltrid, 0,22 µm

5. **Analüüs**

Märkus: Halofuginoon on vaba alusena leelistes ja etüülatsetaadi lahustes ebastabiilne. Seda ei tohiks hoida etüülatsetaadis üle 30 minuti.

5.1. **Üldjuhised**

5.1.1. Tuleb analüüsida võrdlussööta veendumaks, et selles ei ole halofuginooni ega segavaid aineid.

5.1.2. Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus halofuginooni. Kontsentratsiooni 3 mg/kg saamiseks lisatakse 10 g võrdlussöödale 300 µl põhistandardlahust (3.6.1), segatakse ja oodatakse enne ekstraheerimise (5.2) alustamist 10 minutit.

Märkus: Selle meetodi puhul peab võrdlussööt olema prooviga samalaadne ja analüüsimisel ei tohi selles leida halofuginooni.

5.2. **Ekstraheerimine**

10 g valmistatud proovi kaalutakse 0,1 g täpsusega 200 ml tsentrifuugiküvetti, lisatakse 0,5 g naatriumaskorbaati (3.10), 0,5 g EDTAd (3.13) ja 20 ml vett ning segatakse. Küvett asetatakse 5 minutiks veevanni (80 °C). Pärast toatemperatuurini jahutamist lisatakse 20 ml naatriumkarbonaadi lahust (3.15) ja segatakse. Lisatakse kohe 100 ml etüülatsetaati (3.4) ja loksutatakse käes tugevalt 15 sekundit. Küvett asetatakse kolmeks minutiks ultrahelivanni (4.1) ning avatakse kork. Tsentrifuugitakse kaks minutit ja dekanteeritakse etüülatsetaadi faas läbi klaaskiudfiltri (4.6) 500 ml jaotuslehtrisse. Proovi ekstraheerimist korratakse teise 100 ml etüülatsetaadi kogusega. Kogutud ekstrakte pestakse üks minut 50 ml naatriumkloriidiga küllastatud naatriumkarbonaadi lahusega (3.16) ja veekiht valatakse ära.

Orgaanilist kihti ekstraheeritakse 1 minut 50 ml soolhappega (3.17). Alumine happekiht kallatakse 250 ml jaotuslehtrisse. Orgaanilist kihti ekstraheeritakse uuesti 1,5 minutit täiendava 50 ml soolhappega ja lisatakse esimese ekstraktiga. Kogutud happeekstrakte pestakse 10 ml etüülatsetaadiga (3.4) loksutades umbes 10 sekundit.

Veekiht kantakse kvantitatiivselt 250 ml ümarkolbi ja orgaaniline faas valatakse ära. Happelahusest aurutatakse filter-pöördaurusti (2.4) abil kogu allesjäänud etüülatsetaat. Veevanni temperatuur ei tohiks olla üle 40 °C. Umbes 25 millibaarises vaakumis eemaldatakse 5 minutiga temperatuuril 38 °C kogu allesjäänud etüülatsetaat.

5.3. **Puhastamine**

5.3.1. Amberlite'i-kolonni ettevalmistamine

XAD-2 kolonn valmistatakse ette eraldi iga proovi ekstrakti jaoks. 10 g valmistatud Amberlite'i (3.19) kantakse metanooli (3.8) abil klaaskolonni (4.5). Vaigukihi peale pannakse väike klaasvillatropp. Metanool kallatakse kolonnist välja ja vaiku pestakse 100 ml veega, peatades voolu, kui vedelik jõuab vaiguni. Kolonnil lastakse enne kasutamist 10 minutit tasakaalustuda. Kolonni ei tohi kunagi lasta kuivaks voolata.

5.3.2. Proovi puhastamine

Ekstrakt (5.2) kantakse kvantitatiivselt ettevalmistatud Amberlite'i kolonni (5.3.1), elueeritakse, valades eluaadi ära. Elueerimiskiirus ei tohi ületada 20 ml/min. Ümarkolb loputatakse 20 ml soolhappega (3.17) ja seda lahust kasutatakse vaigukolonni pesemiseks. Allesjäänud happelahus kõrvaldatakse õhuvoolu abil. Pesulahused valatakse ära. Kolonni lisatakse 100 ml metanooli (3.8) ja lastakse elueerida 5–10 ml, kogudes eluaadi 250 ml ümarkolbi. Allesjäänud metanoolil lastakse 10 minutit vaiguga tasakaalustuda ja jätkatakse elueerimist kiirusel kuni 20 ml/min, kogudes eluaadi samasse ümarkolbi. Metanool aurutatakse filter-pöördaurusti (4.2) abil, veevanni temperatuur ei tohiks olla üle 40 °C. Jääk kantakse liikuva faasi (3.21) abil kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Täiendatakse liikuva faasiga kuni märgini ja segatakse. Alikvootne osa filtreeritakse läbi membraanfiltri (4.7). See lahus hoitakse HPLC määramise (5.4) jaoks.

5.4. **HPLC määramine**

5.4.1. Parameetrid

Soovitatakse juhinduda järgmistest tingimustest (muid tingimusi võib kasutada juhul, kui need tagavad samaväärsed tulemused):

vedelikkromatograafi kolonn (4.4.1),

HPLC liikuv faas (3.21),

voolukiirus: 1,5–2 ml/min,

avastamise lainepikkus: 243 nm,

süstitav maht: 40–100 µl.

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, süstides korduvalt kaliibrimislahust (3.6.2) kontsentratsiooniga 3,0 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigi kõrgused (pindalad) ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kaliibrimisgraafik

Iga kaliibrimislahust (3.6.2) süstitakse korduvalt ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Koostatakse kaliibrimisgraafik, kandes ordinaatteljele kaliibrimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.4.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.3.2) süstitakse mitu korda samas mahus kui kaliibrimislahuste puhul ja määratakse halofuginoonipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. **Tulemuste arvutamine**

Proovilahuse halofuginoonipiikide keskmise kõrguse (pindala) alusel määratakse kaliibrimisgraafiku (5.4.2) abil proovilahuse kontsentratsioon (µg/ml).

Halofuginoonisisisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemi alusel:

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

milles:

– c: proovilahuse halofuginoonikontsentratsioon (mg/ml),

– m: kaalutise mass grammides.

7. **Tulemuste kontrollimine**

7.1. **Samasus**

Uuritava aine samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 6,0 µg/ml sisaldusega kaliibrimislahuse (3.6.2) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse

Prooviekstraktile lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.6.2). Lisatud halofuginoonikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud halofuginoonikogus.

Lisatud koguse ja ekstrakti lahjenduse arvessevõtmise tulemusena peab tõusma üksnes halofuginoonipiigi kõrgus. Piigi poollaius ei tohi erineda rohkem kui umbes 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti halofuginoonipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine dioodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema. Dioodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;

b) lainepikkustel 225–300 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad kromatogrammil oleva proovi ja standardi piigi tipu spektrid ühte langema. Seda nõuet käsitatakse täidetuna, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;

c) lainepikkustel 225–300 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet käsitatakse täidetuna, kui nimetatud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu vastavatest neeldumisspektritest.

Kui mõni nendest nõuetest ei ole täidetud, ei ole otsitava aine olemasolu tõestatud.

7.2. **Korratavus**

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi kuni 3 mg/kg suuruste halofuginoonisisalduste puhul ületada 0,5 mg/kg.

7.3. **Saagis**

Suurendatud kontsentratsiooniga võrdlusproovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. **Ühisuuringu tulemused**

Korraldati ühisuuring, [1] mille käigus analüüsiti kaheksas laboratooriumis kolme proovi.

Tulemused

	Proov A (võrdlusproov) algul	Proov B (peenestatud)		Proov C (graanulid)	
		algul	kahe kuu pärast	algul	kahe kuu pärast
Keskmi e1	ei leitud	2,80	2,42	2,89	2,45
SR	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CVR	–	16	18	14	17
sg.		86	74	88	75

1: ühikud mg/kg
SR: reprodutseeritavuse standardhälve
CVR: varieerumise koefitsient (%)
sg: saagis (%)

[1] The Analyst 108, 1983, lk 1252–1256.