31993L0117

KAHETEISTKÜMNES KOMISJONI DIREKTIIV 93/117/EÜ,

17. detsember 1993,

millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid söötade ametlikuks kontrollimiseks

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 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 kontrollimine kvaliteeti ja koostist käsitlevatest õigusnormide sätetest tulenevatele nõuetele vastavuse kindlakstegemiseks tuleb läbi viia ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodeid kasutades;

tuleks kehtestada ühenduse analüüsimeetodid söödalisandite robenidiini ja metüülbensokaadi jaoks, et kontrollida kõnealuste söödalisandite söötades kasutamise tingimustele vastavust;

käesoleva direktiiviga ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid nõuavad, et analüüsid söötade robenidiini ja metüülbensokaadi sisalduse määramiseks tuleb läbiviidavate ametlike kontrollide käigus teha käesoleva direktiivi lisas kirjeldatud meetodeid kasutades.

Artikkel 2

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigusnormid hiljemalt 30. novembriks 1994 ja 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 jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Brüssel, 17. detsember 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

1. **ROBENIDIINI MÄÄRAMINE**

1,3-bis[(4-klorobensülideen)amino]guanidiinhüdrokloriid

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Käesolev meetod on robenidiini määramiseks söötades, määramise miinimumpiir on 5 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Proov ekstraheeritakse hapestatud metanooliga. Ekstrakt kuivatatakse ja selle alikvootne osa puhastatakse alumiiniumoksiidi kolonnis. Robenidiin elueeritakse kolonnist metanooliga, kontsentreeritakse ja viiakse liikuva faasiga sobiva mahuni. Robenidiinisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

3.1. *Metanool*

3.2. *Hapestatud metanool*

Viia 4,0 ml soolhapet ($\rho_{20°}$ = 1,18 g/ml) 500 ml mõõtekolbi, täita kolb kuni märgini metanooliga (3.1) ja segada. See lahus tuleks valmistada vahetult enne kasutamist.

3.3. *Atsetonitriil, puhas HPLC jaoks*

3.4. *Molekulaarsõel*

Tüüp 3A, 8–12 mešši (1,62,5 mm osakesed, kristalne alumosilikaat, pooride läbimõõt 0,3 mm)

3.5. *Alumiiniumoksiid: kolonnkromatograafia happelise aktiivsuse aste I*

Panna 100 g alumiiniumoksiidi sobivasse anumasse ja lisada 2,0 ml vett. Sulgeda ja loksutada ligikaudu 20 minutit. Hoida korralikult suletud anumas.

3.6. *Kaaliumdivesinikfosfaadi lahus, c = 0,025 mol/l*

Lahustada 3,40 g kaaliumdivesinikfosfaati 1 000 ml mõõtekolbi kasutades vees (puhas HPLC jaoks), täita kolb märgini veega ja segada.

3.7. *Dinaatriumvesinikfosfaadi lahus, c = 0,025 mol/l*

Lahustada 3,55 g veevaba dinaatriumvesinikfosfaati (või 4,45 g dihüdraati või 8,95 g dodekahüdraati) 1 000 ml mõõtekolbi kasutades vees (puhas HPLC jaoks), täita kolb märgini veega ja segada.

3.8. *HPLC liikuv faas*

Segada järgmised reaktiivid:

650 ml atsetonitriili (3.3),

250 ml vett (puhas HPLC jaoks),

50 ml kaaliumdivesinikfosfaadi lahust (3.6),

50 ml dinaatriumvesinikfosfaadi lahust (3.7).

Filtreerida läbi 0,22 µm filtri (4.6) ja lahus degaseerida (nt töödeldes ultraheliga 10 minutit).

3.9. *Standardaine*

Puhas robenidiin: 1,3-bis[(4-klorobensülideen)amino]guanidiinhüdrokloriid, E 750.

3.9.1. Robenidiini lähtestandardlahus: 300 µg/ml

Kaaluda 0,1 mg täpsusega 30 mg robenidiini standardainet (3.9). Lahustada 100 ml mõõtekolbi kasutades hapestatud metanoolis (3.2), täita kolb märgini sama lahustiga ja segada. Mähkida kolb alumiiniumfooliumi ning hoida pimedas kohas.

3.9.2. Robenidiini keskmine standardlahus: 12 µg/ml

Viia 10,0 ml lähtestandardlahust (3.9.1) 250 ml mõõtekolbi, täita kolb liikuva faasiga (3.8) märgini ja segada. Mähkida kolb alumiiniumfooliumi ja hoida pimedas kohas.

3.9.3. Kalibreerimislahused

Viia 50 ml mõõtekolbidesse 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ja 25,0 ml keskmist standardlahust. Täita kolvid liikuva faasiga märgini ja segada. Lahuste robenidiinisisaldused on vastavalt 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 ja 6,0 µg/ml. Need lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

4. **Vahendid**

4.1. *Klaaskolonn*

Valmistatud tumedast klaasist, korkkraaniga, maht ligikaudu 150 ml, sisemine läbimõõt 10–15 mm, kõrgus 250 mm.

4.2. *Mehaaniline loksuti*

4.3. *Filter-pöördaurusti*

4.4. *HPLC-seadmed erinevatel lainepikkustel registreeriva ultraviolettdetektoriga või dioodaheldetektoriga, mis töötab vahemikus 250–400 nm.*

4.4.1. *Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 µm täidis või selle analoog*

4.5. *Klaaskiudfilterpaber (Whatman GF/A või selle analoog)*

4.6. *Membraanfiltrid, 0,22 µm*

4.7. *Membraanfiltrid, 0,45 µm*

5. **Analüüsi käik**

Märkus

Robenidiin on valgustundlik. Kõikide operatsioonide puhul tuleb kasutada tumedast klaasist laboratoorseid anumaid.

5.1. Üldised märkused

5.1.1. Tuleks analüüsida võrdlussööta, et selles ei oleks robenidiini ega teisi segavaid aineid.

5.1.2. Tuleks määrata regenereeruvus, analüüsides võrdlussööta (5.1.1), mida on rikastatud sama koguse robenidiiniga, nagu seda sisaldab proov. Selleks et rikastada robenidiini tasemel 60 mg/kg, viia 3,0 ml lähtestandardlahust (3.9.1) 250 ml koonilisse kolbi. Aurutada lahust lämmastikuvoolus kuni ligikaudu 0,5 ml-ni. Lisada 15 g võrdlussööta, segada ja oodata 10 minutit enne ekstraheerimist (5.2).

Märkus Selle meetodi rakendamiseks peaks võrdlussööt olema tüübilt sarnane prooviga, ja analüüsi tulemusena ei tohiks robenidiini leida.

5.2. *Ekstraheerimine*

Kaaluda 0,01 g täpsusega ligikaudu 15 g ettevalmistatud proovi. Proov panna 250 ml koonilisse kolbi ja lisada 100,0 ml hapestatud metanooli (3.2), kolb sulgeda ja loksutada üks tund loksutil (4.2). Filtreerida lahus läbi klaaskiudfilterpaberi (4.5) ja koguda kogu filtraat 150 ml koonilisse kolbi. Lisada 7,5 g molekulaarsõela (3.4), sulgeda ja loksutada viis minutit. Filtreerida kohe läbi klaaskiudfilterpaberi. Hoida lahust puhastamisetapiks (5.3).

5.3. *Puhastamine*

5.3.1. Alumiiniumoksiidi kolonni ettevalmistamine

Asetada klaaskolonni (4.1) põhja väike klaasvatist tropp ja suruda see klaaspulka kasutades kokku. Kaaluda 11,0 g ettevalmistatud alumiiniumoksiidi (3.5) ja panna kolonni. Hoolitseda tuleks selle eest, et kokkupuutumine õhuga oleks selles etapis minimaalne. Koputada kergelt vastu kolonni alumist otsa, et alumiiniumoksiid paigutuks ühtlaselt.

5.3.2. Proovi puhastamine

Pipeteerida kolonni 5,0 ml vastavalt punktile 5.2 ettevalmistatud prooviekstrakti. Asetada pipeti ots tihedalt kolonni seina vastu ja lasta lahusel absorbeeruda alumiiniumoksiidi. Elueerida robenidiin kolonnist, kasutades 100 ml metanooli (3.1) voolukiirusel 2–3 ml/min, ja koguda eluaat 250 ml ümarkolbi. Metanoolilahus aurutada filter-pöördaurusti (4.3) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustada uuesti 3–4 ml liikuvas faasis (3.8) ja viia kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Loputada kolbi mitme 1–2 ml liikuva faasi osadega ja panna need loputusvedelikud mõõtekolbi. Täita kolb sama lahustiga märgini ja segada. Filtreerida lahuse alikvootne osa läbi 0,45 µm membraanfiltri (4.7). Hoida see lahus HPLC määramiseks (5.4).

5.4. *HPLC määramine*

5.4.1. Parameetrid

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

vedelikkromatograafia kolonn (4.4.1),

HPLC liikuv faas (3.8),

voolu kiirus: 1,5–2 ml/min,

detekteerimise lainepikkus: 317 nm,

süstitav maht: 20–50 µl.

Kontrollida kromatograafilise süsteemi stabiilsust, süstides 3,6 µg/ml sisaldavat kalibreerimislahust (3.9.3) mitu korda, kuni saavutatakse konstantsed piigi kõrgused ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kalibreerimisgraafik

Süstida iga kalibreerimislahust (3.9.3) mitu korda ja mõõta iga kontsentratsiooni puhul piigi kõrgused (pindalad). Tõmmata kalibreerimiskõver, kasutades kalibreerimislahuste keskmisi piigi kõrgusi või pindalasid ordinaatidena ja vastavaid kontsentratsioone µg/ml abstsissidena.

5.4.3. Proovilahus

Süstida prooviekstrakti (5.3.2) mitu korda, kasutades sama mahtu nagu kalibreerimislahuste puhul, ja määrata robenidiini piikide keskmine kõrgus (pindala).

6. **Tulemuste arvutamine**

Proovilahuse robenidiini piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi määrata proovilahuse kontsentratsioon µg/ml, kasutades kalibreerimisgraafikut (5.4.2).

Robenidiini sisaldus w (mg/kg) proovis arvutatakse järgmise valemiga:

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

kus:

c = proovilahuse robenidiini kontsentratsioon µg/ml,

m = proovi mass grammides.

7. **Tulemuste kehtivuse kontroll**

7.1. *Identsus*

Analüüsiga määratava robenidiini identsust saab kinnitada kokromatograafiaga või kasutades dioodaheldetektorit, mille abil võrreldakse prooviekstrakti ja 6 µg/ml sisaldava kalibreerimislahuse (3.9.3) spektreid.

7.1.1. Kokromatograafia

Prooviekstrakti robenidiini kontsentratsiooni suurendatakse, lisades kalibreerimislahust (3.9.3) sobivas koguses. Lisatav robenidiini kogus peaks olema enam-vähem võrdne prooviekstrakti analüüsimisel leitud robenidiini kogusega.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peaks kasvama ainult robenidiini piigi kõrgus. Piigi laius maksimumkõrguse keskpaigas ei tohi erineda selle esialgsest väärtusest rohkem kui 10 %.

7.1.2. Dioodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

a) proovi ja standardi spektrite maksimumneeldumise lainepikkused, mis on registreeritud kromatogrammi piigi tipus, peavad langema kokku detekteerimissüsteemi lahutusvõime määratud piires. Dioodaheldetektori puhul on see tavaliselt ligikaudu 2 nm;

b) 250 ja 400 nm vahel ei tohi kromatogrammi piigi tipus registreeritud proovi ja standardi spektrid teineteisest erineda nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. See kriteerium on täidetud, kui samad maksimumid on olemas ja kui üheski vaadeldud punktis ei ületa spektritevaheline hälve 15 % standardi neeldumisest;

c) 250 ja 400 nm vahel ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. See kriteerium on täidetud, kui samad maksimumid on olemas ja kui üheski vaadeldud punktis ei ületa spektritevaheline hälve 15 % tipu neeldumisspektrist.

Kui üks nendest kriteeriumidest ei ole täidetud, ei ole ka analüüsiga määratava robenidiini olemasolu kinnitatud.

7.2. *Korratavus*

Sama proovi kahe paralleelmääramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % suuremast tulemusest robenidiinisisalduse puhul, mis on suuremad kui 15 mg/kg.

7.3. *Saagis*

Võrdlussöödale lisatud robenidiini saagis peaks olema vähemalt 85 %.

8. **Ühisuurimuse tulemused**

Ühendus korraldas ühisuurimuse, milles 12 laboratooriumi analüüsisid nelja lindude ja küülikute sööda proovi jahu või graanulite kujul. Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi. Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Kodulinnud		Küülikud	
	Jahu	Graanulid	Jahu	Graanulid
Keskmine (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
Saagis (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr = korratavuse standardhälve
CVr = korratavuse variatsioonitegur
SR = reprodutseeritavuse standardhälve
CVR = reprodutseeritavuse variatsioonitegur

2. METÜÜLBENSOKAADI MÄÄRAMINE

7-bensüüloksü-6-butüül-3-metoksükarbonüül-4-kinoloon

1. **Eesmärk ja rakendusala**

Meetod on metüülbensokaadi määramiseks söötades. Määramise miinimumpiir on 1 mg/kg.

2. **Põhimõte**

Metüülbensokaat ekstraheeritakse proovist metaansulfoonhappe metanooli lahusega. Ekstrakt puhastatakse diklorometaaniga ioonvahetuskromatograafia abil ja seejärel uuesti diklorometaaniga. Metüülbensokaadi sisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. **Reaktiivid**

3.1. Diklorometaan

3.2. Metanool, puhas HPLC jaoks

3.3. HPLC liikuv faas:

metanooli (3.2) ja vee (puhas HPLC jaoks) segu mahuvahekorras 75/25

Filtreerida läbi 0,22 µm filtri (4.5) ja degaseerida lahus (nt töödeldes ultraheliga 10 minuti jooksul).

3.4. Metaansulfoonhappe lahus, σ = 2 %

Lahjendada 20,0 ml metaansulfoonhapet metanooliga (3.2) 1 000 ml-ni.

3.5. Soolhappe lahus, σ = 10 %

Lahjendada 100 ml soolhapet ($\rho_{20°}$ = 1,18 g/ml) veega 1 000 ml-ni.

3.6. Kationiit Amberlite CG-120 (Na-vormis), 100–200 mešši

Kationiiti töödeldakse enne kasutamist: valmistada 100 g kationiidi suspensiooni 500 ml soolhappe lahuses (3.5) ja kuumutada kuumal plaadil pidevalt segades keemiseni. Lasta jahtuda ja dekanteerida hape. Filtreerida läbi filterpaberi, kasutades vaakumit. Pesta kationiiti kaks korda 500 ml veeportsjonitega ja seejärel 250 ml metanooliga (3.2). Loputada kationiiti veel 250 ml metanooliga ja kuivatada filtrikoogist õhku läbi lastes. Kuivatatud kationiiti hoida korgiga suletud pudelis.

3.7. Standardaine: puhas metüülbensokaat (7-bensüüloksü-6-butüül-3-metoksükarbonüül-4-kinoloon)

3.7.1. Metüülbensokaadi lähtestandardlahus, 500 µg/ml

Kaaluda 0,1 mg täpsusega 50 mg standardainet (3.7), lahustada 100 ml mõõtekolbi kasutades metaansulfoonhappe lahuses (3.4), täita kolb märgini ja segada.

3.7.2. Metüülbensokaadi keskmine standardlahus, 50 µg/ml

Viia 5,0 ml metüülbensokaadi lähtestandardlahust (3.7.1) 50 ml mõõtekolbi, täita kolb metanooliga (3.2) märgini ja segada.

3.7.3. Kalibreerimislahused

Viia vastavalt 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ja 5,0 ml metüülbensokaadi keskmist standardlahust (3.7.2) 25 ml mõõtekolbidesse. Täita kolvid liikuva faasiga (3.3) märgini ja segada. Lahuste metüülbensokaadi kontsentratsioonid on vastavalt 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ja 10,0 µg/ml. Need lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

4. **Vahendid**

4.1. Loksuti

4.2. Filter-pöördaurusti

4.3. Klaaskolonn (250 mm × 15 mm) korkkraaniga, maht ligikaudu 200 ml

4.4. HPLC-seadmed erinevatel lainepikkustel registreeriva ultraviolettdetektori või dioodaheldetektoriga

4.4.1. Vedelikkromatograafia kolonn: 300 mm × 4 mm, C-18, 10 µm täidis või selle analoog

4.5. Membraanfiltrid, 0,22 µm

4.5. Membraanfiltrid, 0,45 µm

5. **Analüüsi käik**

5.1. *Üldised märkused*

5.1.1. Analüüsida võrdlussööta, et selles ei oleks metüülbensokaati ega teisi segavaid aineid.

5.1.2. Tuleks määrata regenereeruvus, analüüsides võrdlussööta, mida on rikastatud sama koguse metüülbensokaadiga, nagu seda sisaldab proov. Selleks et rikastada metüülbensokaati tasemel 15 mg/kg, lisada 600 µl lähtestandardlahust (3.7.1) 20 g võrdlussöödale, segada ja oodata 10 minutit enne ekstraheerimist (5.2).

5.2. *Ekstraheerimine*

Kaaluda 0,01 g täpsusega ligikaudu 20 g ettevalmistatud proovi ja viia 250 ml koonilisse kolbi. Lisada 100,0 ml metaansulfoonhappe lahust (3.4) ja loksutada mehaaniliselt (4.1) 30 minutit. Filtreerida lahus läbi filterpaberi ja hoida filtraat alles vedelik-vedelik ekstraktsiooniks (5.3).

5.3. *Vedelik-vedelik ekstraktsioon*

Viia 500 ml jaotuslehtrisse, mis sisaldab 100 ml soolhappe lahust (3.5), 25,0 ml punktis 5.2 saadud filtraati. Lisada lehtrisse 100 ml diklorometaani (3.1) ja loksutada üks minut. Lasta kihtidel eralduda ning viia alumine (diklorometaani) kiht 500 ml ümarkolbi. Korrata veefaasi ekstraheerimist veel kahe 40 ml portsjoni diklorometaaniga ja ühendada need esimese ekstraktiga ümarkolvis. Diklorometaani ekstrakt aurutada filter-pöördaurusti (4.2) abil kuivaks vähendatud rõhul, temperatuuril 40 °C. Jääk lahustada 20–25 ml metanoolis (3.2), sulgeda kolb ja hoida kogu ekstrakt ioonvahetuskromatograafiaks (5.4).

5.4. *Ioonvahetuskromatograafia*

5.4.1. Katioonvahetuskolonni ettevalmistamine

Asetada klaasvatist tropp klaaskolonni (4.3) põhja. Valmistada 5,0 g töödeldud kationiidi suspensiooni (3.6) 50 ml-s soolhappes (3.5), valada klaaskolonni ja lasta settida. Lasta liigsel happel läbi kolonni voolata, kuni happe nivoo on jõudnud kationiidi ülemise pinnani, ja pesta kolonni veega, kuni väljavoolav pesuvesi on lakmuse suhtes neutraalne. Viia 50 ml metanooli (3.2) kolonni ja lasta läbi kolonni voolata, kuni metanooli nivoo on jõudnud kationiidi pinnani.

5.4.2. Kolonnkromatograafia

Viia pipeti abil ettevaatlikult punktis 5.3 saadud ekstrakt kolonni. Loputada ümarkolbi kahe 5–10 ml metanooliportsjoniga (3.2) ja viia need pesuvedelikud kolonni. Lasta ekstraktil läbi kolonni voolata, kuni ekstrakti nivoo on jõudnud kationiidi pinnani, ja pesta kolonni 50 ml metanooliga nii, et voolu kiirus ei ületa 5 ml minutis. Kallata väljavoolanud vedelik ära. Elueerida metüülbensokaat kolonnist, kasutades 150 ml metaansulfoonhapet (3.4), ja koguda kolonni eluaat 250 ml koonilisse kolbi.

5.5. *Vedelik-vedelik ekstraktsioon*

Viige punktis 5.4.2 saadud eluaat 1-liitrilisse jaotuslehtrisse. Loputada koonilist kolbi 5–10 ml metanooliga (3.2) ja lisada loputusvedelikud samasse jaotuslehtrisse. Lisada 300 ml soolhappe lahust (3.5) ja 130 ml diklorometaani (3.1). Loksutada üks minut ja lasta faasidel eralduda. Viia alumine (diklorometaani) kiht 500 ml ümarkolbi. Korrata veefaasi ekstraheerimist veel kahe 70 ml portsjoni diklorometaaniga ja ühendada need ekstraktid esimesega ümarkolvis.

Aurutada diklorometaani ekstrakt filter-pöördaurustis (4.2) kuivaks vähendatud rõhul temperatuuril 40 °C. Jääk lahustada kolvis ligikaudu 5 ml metanooliga (3.2) ja viia lahus kvantitatiivselt 10 ml mõõtekolbi. Loputada ümarkolb veel kahe portsjoni 1–2 ml metanooliga ja viia need mõõtekolbi. Täita kolb märgini metanooliga ja segada. Filtreerida lahuse alikvootne osa läbi membraanfiltri. Hoida lahus HPLC-määramiseks (5.6).

5.6. *HPLC-määramine*

5.6.1. Parameetrid

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

— vedelikkromatograafia kolonn (4.4.1),

— HPLC liikuv faas: metanooli ja vee segu (3.3),

— voolu kiirus: 1–1,5 ml/min,

— detekteerimise lainepikkus: 265 nm,

— süstitav maht: 20–50 µl.

Kontrollida kromatograafilise süsteemi stabiilsust, süstides 4 µg/ml sisaldavat kalibreerimislahust (3.7.3) mitu korda, kuni saavutatakse konstantsed piigi kõrgused ja retentsiooniajad.

5.6.2. Kalibreerimisgraafik

Süstida iga kalibreerimislahust (3.7.3) mitu korda ja mõõta iga kontsentratsiooni puhul piigi kõrgused (pindalad). Koostada kalibreerimisgraafik, kasutades kalibreerimislahuste keskmisi piigi kõrgusi või pindalasid ordinaatidena ja vastavaid kontsentratsioone (µg/ml) abstsissidena.

5.6.3. Proovilahus

Süstida prooviekstrakti (5.5) mitu korda, kasutades sama mahtu nagu kalibreerimislahuste puhul, ning määrata metüülbensokaadi piigi keskmine kõrgus (pindala).

6. **Tulemuste arvutamine**

Määrata proovilahuse kontsentratsioon µg/ml proovilahuse metüülbensokaadi piikide keskmise kõrguse (pindala) järgi, kasutades kalibreerimisgraafikut (5.6.2).

Proovi metüülbensokaadi sisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemiga:

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

kus:

c = proovilahuse metüülbensokaadi kontsentratsioon µg/ml,

m = proovi mass grammides.

7. **Tulemuste kehtivuse kontroll**

7.1. *Identsus*

Analüüsiga määratava metüülbensokaadi identsust saab kinnitada kokromatograafiaga või kasutades dioodaheldetektorit, mille abil võrreldakse prooviekstrakti ja 10 µg/ml sisaldava kalibreerimislahuse (3.7.3) spektreid.

7.1.1. Kokromatograafia

Prooviekstrakti metüülbensokaadi kontsentratsiooni suurendatakse, lisades keskmist standardlahust (3.7.2) sobivas koguses. Lisatav metüülbensokaadi kogus peaks olema sarnane prooviekstrakti analüüsil leitud metüülbensokaadi kogusega.

Võttes arvesse nii lisatud kogust kui ka ekstrakti lahjendust, peab kasvama ainult metüülbensokaadi piigi kõrgus. Piigi laius maksimumkõrguse keskpaigas ei tohi erineda selle esialgsest väärtusest rohkem kui 10 %.

7.1.2. Dioodireadetektori kasutamine

Tulemusi hinnatakse vastavalt järgmistele kriteeriumidele:

a) proovi ja standardi spektrite maksimumneeldumise lainepikkused, mis on registreeritud kromatogrammi piigi tipus, peavad langema kokku detekteerimissüsteemi lahutusvõime määratud piires. Dioodaheldetektori puhul on see tavaliselt ligikaudu 2 nm;

b) 220 ja 350 nm vahel ei tohi kromatogrammi piigi tipus registreeritud proovi ja standardi spektrid teineteisest erineda nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. See kriteerium on täidetud, kui samad maksimumid on olemas ja kui üheski vaadeldud punktis ei ületa spektritevaheline hälve 15 % standardi neeldumisest;

c) 220 ja 350 nm vahel ei tohi prooviekstrakti kromatogrammi piigi ülespoole suunduvas osas, tipus ja allapoole suunduvas osas registreeritud spektrid erineda üksteisest nende spektriosade puhul, mis jäävad 10–100 % suhtelise neeldumise piirkonda. See kriteerium on täidetud, kui samad maksimumid on olemas ja kui üheski vaadeldud punktis ei ületa spektritevaheline hälve 15 % tipu neeldumisspektrist.

Kui üks nendest kriteeriumidest ei ole täidetud, ei ole ka analüüsiga määratava metüülbensokaadi olemasolu kinnitatud.

7.2. *Korratavus*

Sama proovi kahe paralleelmääramise tulemuste erinevus ei tohi ületada 10 % suuremast tulemusest metüülbensokaadi sisalduste puhul, mis jäävad 4–20 mg/kg vahele.

7.3. *Saagis*

Võrdlussöödale lisatud metüülbensokaadi saagis peaks olema vähemalt 90 %.

8. **Ühisuurimuse tulemused**

10 laboratooriumit analüüsisid viit proovi. Iga proovi puhul tehti kaks analüüsi.

Tulemused

Võrdlussööt	Jahu 1	Graanulid 1	Jahu 2	Graanulid 2	
Keskmine (mg/kg)	ei leitud	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
Regenereeruvus (%)	–	92,00	93,0	92,00	89,00

Sr = korratavuse standardhälve;
CVr = korratavuse variatsioonitegur;
SR = reprodutseeritavuse standardhälve;
CVR = reprodutseeritavuse variatsioonitegur.