

31999L0027

L 118/36

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

6.5.1999

KOMISJONI DIREKTIIV 1999/27/EÜ,

20. aprill 1999,

millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetodid amprooliumi, diklasuriili ja karbadoksi määramiseks söötades ning muudetakse direktiive 71/250/EMÜ ja 73/46/EMÜ ja tunnistatakse kehtetuks direktiiv 74/203/EMÜ

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1970. aasta direktiivi 70/373/EMÜ ühenduse söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud proovivõtu- ja analüüsimeetodite kehtestamise kohta ⁽¹⁾ (viimati muudetud Austria, Soome ja Rootsi ühinemise-aktiga), eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

- (1) direktiivis 70/373/EMÜ on ette nähtud söötade ametlik kontrollimine selle kindlakstegemiseks, kas nad vastavad söötade kvaliteeti ja koostist reguleerivate õigus- ja haldusnormide nõuetele, tuleb teha ühenduse proovivõtu- ja analüüsimeetodite abil;
- (2) nõukogu 23. novembri 1970. aasta söödalisanalüüsimeetodite käsitlev direktiiv 70/524/EMÜ, ⁽²⁾ viimati muudetud komisjoni määrusega 45/1999, ⁽³⁾ näeb ette, et eelsegudele ja söötadele lisatud amprooliumi ja diklasuriili sisaldus peab olema näidatud märgistusel; karbadoksi söödalisanalüüsimeetodite kasutamise luba on tagasi võetud komisjoni 22. detsembri 1998. aasta määrusega 2788/98, millega muudetakse söödalisanalüüsimeetodite käsitlevat nõukogu direktiivi 70/524/EMÜ selles osas, mis käsitleb teatavate kasvukiirendajate kasutusloa tagasivõtmist; ⁽⁴⁾ seega on keelatud ainete võimaliku ebaseadusliku kasutamise ülevaade ametlikku kontrolli;
- (3) nende ainete kontrollimiseks tuleb kehtestada ühenduse analüüsimeetodid;
- (4) esimene komisjoni 15. juuni 1971. aasta direktiiv 71/250/EMÜ, millega kehtestatakse söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud ühenduse analüüsimeetodid ⁽⁵⁾ (viimati muudetud direktiiviga 98/54/EÜ ⁽⁶⁾), sätestab analüüsimeetodid muu hulgas ka sinapiõli ja teobromiini määramiseks; teaduse ja tehnika edusamme silmas pidades kirjeldatud meetodid enam ei kehti; seetõttu on asjakohane kõnealused meetodid välja jätta;

- (5) neljas komisjoni 5. detsembri 1972. aasta direktiiv 73/46/EMÜ, millega kehtestatakse söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud ühenduse analüüsimeetodid ⁽⁷⁾ (viimati muudetud direktiiviga 98/54/EÜ), sätestab analüüsimeetodid muu hulgas ka retinooli (vitamiin A) määramiseks; vastavaid teaduse ja tehnika edusamme silmas pidades kirjeldatud meetod enam ei kehti; seetõttu on asjakohane kõnealune retinooli määramise meetod välja jätta;
- (6) viies komisjoni 25. märtsi 1974. aasta direktiiv 74/203/EMÜ, millega kehtestatakse söötade ametlikuks kontrollimiseks ettenähtud ühenduse analüüsimeetodid ⁽⁸⁾ (viimati muudetud direktiiviga 81/680/EMÜ ⁽⁹⁾), sätestab analüüsimeetodid tärklise ja kõrge molekulmassiga tärkliselõhustamisproduktide määramiseks peedilõike, peedipulpi, kuivatatud peedipealseid või -lehti, kartulipulpi, kuivatatud pärm, inuliinirikkeid tooteid või rasvakooreid, amprooliumi, etopabaati, dinitolmiidi, nikarbasiini ja menadiooni (vitamiin K3) sisaldavates söötades; teaduse ja tehnika edusamme silmas pidades ei kehti enam ükski kõnealuses direktiivis kirjeldatud meetod; seetõttu on asjakohane tunnistada käesolev direktiiv kehtetuks;
- (7) käesolevas direktiivis sätestatud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Liikmesriigid sätestavad, et söötade ja eelsegude amprooliumi-, diklasuriili- ja karbadoksisisalduse ametlikuks kontrollimiseks korraldatavad analüüsid tehakse käesoleva direktiivi lisas ettenähtud meetodeid kasutades.

⁽¹⁾ EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.⁽²⁾ EÜT L 270, 14.12.1970, lk 1.⁽³⁾ EÜT L 6, 12.1.1999, lk 3.⁽⁴⁾ EÜT L 347, 23.12.1998, lk 31.⁽⁵⁾ EÜT L 155, 12.7.1971, lk 13.⁽⁶⁾ EÜT L 208, 24.7.1998, lk 49.⁽⁷⁾ EÜT L 83, 30.3.1973, lk 21.⁽⁸⁾ EÜT L 108, 22.4.1974, lk 7.⁽⁹⁾ EÜT L 246, 29.8.1981, lk 32.

Artikkel 2

Direktiivi 71/250/EMÜ muudetakse järgmiselt.

1. Artiklist 1 jäetakse välja sõnad "sinepiõli" ja "teobromiin".
2. Lisa punktid 8 ja 13 jäetakse välja.

Artikkel 3

Direktiivi 73/46/EMÜ muudetakse järgmiselt.

1. Artikkel 2 jäetakse välja.
2. II lisa jäetakse välja.

Artikkel 4

Direktiiv 74/203/EMÜ tunnistatakse kehtetuks.

Artikkel 5

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi sätete järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 31. oktoobril 1999. Nad teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Liikmesriigid kohaldavad sätestatud meetmeid alates 1. novembrist 1999.

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

Artikkel 6

Käesolev direktiiv jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Artikkel 7

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 20. aprill 1999

Komisjoni nimel
komisjoni liige
Franz FISCHLER

LISA

A OSA

AMPROOLIUMI MÄÄRAMINE

1-[(4-amino-2-propüülpürimidiin-5-üül)metüül]-2-metüülpüridiiniumkloriidhüdrokloriid

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on amprooliumi määramiseks söötades ja eelsegudes. Avastamiskünnis on 1 mg/kg, määramispiir 25 mg/kg.

2. Põhimõte

Proov ekstraheeritakse metanooli vesilahuses. Pärast liikuva faasiga lahjendamist ja membraanfiltreerimist määratakse amprooliumisisaldus kõrgefektiivse katioonivahetusvedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Metanool.

3.2. Atsetonitriil, HPLC-puhas.

3.3. Vesi, HPLC-puhas.

3.4. Naatriumdiveinikfosfaadi lahus, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

1000 ml mõõtekolbi kasutades lahustatakse vees (3.3) 13,80 g naatriumdiveinikfosfaadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (3.3) kuni märgini ja segatakse.

3.5. Naatriumperklooraadi lahus, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

1000 ml mõõtekolbi kasutades lahustatakse vees (3.3) 224,74 g naatriumperklooraadi monohüdraati, täidetakse kolb veega (3.3) kuni märgini ja segatakse.

3.6. HPLC liikuv faas (vt märkus 9.1).

Atsetonitriili (3.2), naatriumdiveinikfosfaadi lahuse (3.4) ja naatriumperklooraadi lahuse (3.5) segu, $450 + 450 + 100$ (ruumala järgi). Enne kasutamist filtreeritakse lahus läbi $0,22 \mu\text{m}$ membraanfiltrit (4.3) ja degaseeritakse (nt ultrahelivannis (4.4) vähemalt 15 minutit).

3.7. Standardaine: puhas amproolium, 1-[(4-amino-2-propüülpürimidiin-5-üül)metüül]-2-metüülpüridiiniumkloriidhüdrokloriid, E 750 (vt 9.2).

3.7.1. Amprooliumi põhistandardlahus, $500 \mu\text{g/ml}$

Võetakse 50 mg amprooliumi (3.7) kaalutis täpsusega 0,1 mg, pannakse see 1000 ml mõõtekolbi, lahustatakse 80 ml metanoolis (3.1) ja asetatakse kolb 10 minutiks ultrahelivanni (4.4). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril 4°C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.7.2. Amprooliumi vahestandardlahus, $50 \mu\text{g/ml}$

Pipetitakse 5 ml põhistandardlahust (3.7.1) 50 ml mõõtekolbi, täidetakse see ekstrahendiga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Temperatuuril 4°C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.7.3. Kaliibrimislahused

Pannakse 0,5, 1 ja 2 ml vahestandardlahust (3.7.2) 50 ml mõõtekolbidesse. Täidetakse kolvid liikuva faasiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Nende lahuste amprooliumisisaldus on 0,5, 1 ja $2 \mu\text{g/ml}$. Lahused tuleb valmis-tada vahetult enne kasutamist.

3.8. Ekstrahent

Metanool (3.1) + vesi, 2 + 1 (ruumala järgi).

4. Seadmed

4.1. HPLC seade koos injektioonisüsteemiga, mis võimaldab injekteerida 100 µl.

4.1.1. Vedelikkromatograafiakolonn, 125 × 4 mm, täidis: katioonvahetaja Nucleosil 10 SA, 10 µm või samaväärne.

4.1.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor.

4.2. Membraanfilter, polütetrafluoroetüleenist, 0,45 µm.

4.3. Membraanfilter, 0,22 µm.

4.4. Ultrahelivann.

4.5. Mehaaniline loksuti või magnetsegur.

5. Analüüsi käik

5.1. Üldosa

5.1.1. Võrdlussööt

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs veendumaks, et selles ei ole ei amprooliumi ega segavaid aineid. Võrdlussööt peab olema prooviga samalaadne ja amprooliumi või segavaid aineid ei tohi selles olla avastataval määral.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus amprooliumi. Et saada kontsentratsiooni 100 mg/kg, kantakse 10 ml põhistandardlahust (3.7.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurutatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitrini. Lisatakse 50 g võrdlussööta, segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne ekstraheerimist (5.2) asumist veel mitu korda.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardlisandi meetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur amprooliumikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Eelsegud (amprooliumisisaldus < 1 %) ja söödad

Olenevalt amprooliumisisaldusest võetakse 5–40 g proovi kaalutis täpsusega 0,01 g, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Ultrahelivannist võetud kolbi loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse (vt märkus 9.3). 5–10 ml lahjendatud lahust filtreeritakse läbi membraanfiltril (4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud (amprooliumisisaldus ≥ 1 %)

Olenevalt amprooliumisisaldusest võetakse 1–4 g eelsegu kaalutis täpsusega 0,001 g, kantakse see 500 ml koonilisse kolbi ja lisatakse 200 ml ekstrahenti (3.8). Kolb asetatakse ultrahelivanni (4.4) ja jäetakse 15 minutiks seisma. Ultrahelivannist võetud kolbi loksutatakse loksutil või segatakse magnetseguril (4.5) üks tund. Ekstrakti alikvoot lahjendatakse liikuva faasiga (3.6) amprooliumisisalduseni 0,5–2 µg/ml ja segatakse. 5–10 ml lahjendatud lahust filtreeritakse läbi membraanfiltril (4.2). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. Parameetrid

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

Vedelikkromatograafiakolonn (4.1.1.):	125 × 4 mm, täidis: katioonvahetaja Nucleosil 10 SA, 10 µm või sama-väärne
Liikuv faas (3.6):	atsetonitrili (3.2), naatriumdivesinikfosfaadi lahuse (3.4) ja naatriumperkloraadi lahuse (3.5) segu, 450 + 450 + 100 (ruumala järgi)
Voolukiirus:	0,7–1 ml/min
Lainepikkus, mille juures määramine toimub:	264 nm
Injektsioonimaht:	100 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, injekterides korduvalt kaliibrimislahust (3.7.3) kontsentratsiooniga 1,0 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kaliibrimisgraafik

Iga kaliibrimislahust (3.7.3) injekteeritakse korduvalt ja määratakse igale kontsentratsioonile vastavad keskmised piigi kõrgused (pindalad). Ehitatakse kaliibrimisgraafik, kandes ordinaatteljele kaliibrimislahuste keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Prooviekstrakti (5.2) injekteeritakse mitu korda samas mahus mis kaliibrimislahuste puhul ja määratakse amprooliumipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse amprooliumipiikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kaliibrimisgraafiku (5.3.2) abil proovilahuse kontsentratsioon (µg/ml).

Proovi amprooliumisisaldus w (mg/kg) arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$w = \frac{V \cdot \beta \cdot f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kus:

V = vastavalt punktile 5.2 võetud ekstrahendi (3.8) maht, ml (s.o 200 ml)

β = amprooliumi kontsentratsioon (µg/ml) prooviekstraktis (5.2)

f = punkti 5.2 kohane lahjendusfaktor

m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)

7. Tulemuste kontrollimine

7.1. Samasus

Uuritava aine samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades dioodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2) ja 2,0 µg/ml sisaldusega kaliibrimislahuse (3.7.3) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse

Prooviekstraktile (5.2) lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.7.3). Lisatud amprooliumikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud amprooliumikogus.

Lisatud koguse ja ekstrakti lahjenduse arvessevõtmise tulemusena peab tõusma üksnes amprooliumipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti amprooliumipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema; diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- b) lainepikkustel 210–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad kromatogrammil oleva proovi ja standardi piigi tipu spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 210–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

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

7.2. Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada

- 15 % suuremast tulemusest amprooliumisisalduse vahemikus 25–500 mg/kg,
- 75 mg/kg amprooliumisisalduse vahemikus 500–1000 mg/kg,
- 7,5 % suuremast tulemusest, kui amprooliumisisaldus on suurem kui 1000 mg/kg.

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga (võrdlus)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühisuuring, mille käigus analüüsiti kolme kodulindude sööta (proovid 1–3), ühte mineraalsööta (proov 4) ja ühte eelsegu (proov 5). Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 1 (võrdlussööt)	Proov 2	Proov 3	Proov 4	Proov 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
keskmine [mg/kg]	—	45,5	188	5129	25 140
sr [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
sR [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CVR [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominaalsisaldus [mg/kg]	—	50	200	5000	25 000

L: laboratooriumide arv

n: üksikmääramiste arv

sr: korratavust iseloomustav standardhälve

CVr: korratavust iseloomustav variatsioonikoefitsient

sR: reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CVR: reprodutseeritavust iseloomustav variatsioonikoefitsient

9. Märkused

- 9.1. Kui proov sisaldab tiamiini, ilmub kromatogrammil tiamiiniipiik veidi enne amprooliumipiiki. Käesoleva meetodi kohaselt peavad amproolium ja tiamiin teineteisest eralduma. Kui amproolium ja tiamiin kolonnis (4.1.1) teineteisest siiski ei eraldu, tuleb kuni 50 % liikuva faasi (3.6) atsetonitriilist asendada metanooliga.
- 9.2. Briti farmakopöa andmetel on amprooliumi soolhappelahuse (0,1 mol/l) neeldumismaksimumid 246 ja 262 nm juures; neelduvus on 246 nm juures 0,84 ja 262 nm juures 0,80.
- 9.3. Ekstrakt tuleb iga kord liikuva faasiga lahjendada, sest vastasel korral võib amprooliumipiigi retentsiooniaeg ioontugevuse muutuste tõttu oluliselt nihkuda.

B OSA**DIKLASURIILI MÄÄRAMINE**

(+)-4-klorofenüül [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diookso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül] atsetonitriil

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on diklasuriili määramiseks söötades ja eelsegudes. Avastamiskünnis on 0,1 mg/kg, määramispiir 0,5 mg/kg.

2. Põhimõte

Pärast sisestandardi lisamist ekstraheeritakse proov hapestatud metanooliga. Söötade puhul puhastatakse ekstrakti alikvoot tahkete ainete jaoks ettenähtud C18-ekstraktsioonihülsis. Diklasuriil elueeritakse ekstraheermishülsist välja hapestatud metanooli ja vee seguga. Pärast lahuse kokkuaurutamist lahustatakse jääk N,N-dimetüülformamiidi vesilahuses. Eelsegude puhul aurutatakse ekstrakt kokku kohe ja jääk lahustatakse N,N-dimetüülformamiidi vesilahuses. Diklasuriilisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades kolmekomponendilist gradienti ja UV-detektorit.

3. Reaktiivid

- 3.1. Vesi, HPLC-puhas.
- 3.2. Ammooniumatsetaat.
- 3.3. Tetrabutüülammooniumvesiniksulfaat (TBHS).
- 3.4. Atsetonitriil, HPLC-puhas.
- 3.5. Metanool, HPLC-puhas.
- 3.6. N,N-dimetüülformamiid (DMF).
- 3.7. Soolhape, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.
- 3.8. Standardaine: diklasuriil II-24: tagatud puhtusega (+)-4-klorofenüül-[2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diookso-1,2,4-triasiin-2-üül) fenüül]atsetonitriil, E771.
 - 3.8.1. Diklasuriili põhistandardlahus, 500 µg/ml.

Võetakse 25 mg diklasuriili standardaine (3.8) kaalutis täpsusega 0,1 mg ja asetatakse see 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse N,N-dimetüülformamiidis (3.6), täidetakse kolb N,N-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni määrgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril ≤ 4 °C säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.8.2. Diklasuriili standardlahus, 50 µg/ml.

Pannakse 5,00 ml põhistandardlahust (3.8.1) 50 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb *N,N*-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.9. Sisestandardaine: 2,6-dikloro- α -(4-klorofenuül)-4-(4,5-dihüdro-3,5-diookso-1,2,4-triasiin-2(3H)-üül)-a-metüülbenseenatsetonitriil.

3.9.1. Sisepõhistandardlahus, 500 µg/ml.

Võetakse 25 mg sisestandardaine (3.9) kaalutis täpsusega 0,1 mg ja asetatakse see 50 ml mõõtekolbi. Lahustatakse *N,N*-dimetüülformamiidis (3.6), täidetakse kolb *N,N*-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.9.2. Sisestandardlahus, 50 µg/ml.

Pannakse 5,00 ml sisepõhistandardlahust (3.9.1) 50 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb *N,N*-dimetüülformamiidiga (3.6) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.9.3. Sisestandardlahus eelsegude jaoks, p/1000 mg/ml (p = diklasuriili nominaalsisaldus eelsegus, mg/kg).

Võetakse p/10 mg sisestandardlahuse kaalutis täpsusega 0,1 mg, asetatakse 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse ultrahelivanni (4.6) kasutades *N,N*-dimetüülformamiidis (3.6), täidetakse kolb *N,N*-dimetüülformamiidiga kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat kolbi ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.10. Kaliibrimislahus, 2 µg/ml.

Pipetatakse 2,00 ml diklasuriili standardlahust (3.8.2) ja 2,00 ml sisestandardlahust (3.9.2) 50 ml mõõtekolbi. Lisatakse 16 ml *N,N*-dimetüülformamiidi (3.6), täidetakse kolb veega kuni märgini ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.11. Tahkefaasiline C18-ekstraktsioonihülss (nt Bond Elut), maht: 1 cm³, sorbendi mass: 100 mg.

3.12. Ekstrahent: hapestatud metanool.

Pipetatakse 5,0 ml soolhapet (3.7) 1000 ml metanoolisse (3.5) ja segatakse.

3.13. HPLC liikuv faas.

Eluent A: ammooniumatsetaadi ja tetrabutüülammooniumvesiniksulfaadi lahus.

3.13.1. Lahustatakse 5 g ammooniumatsetaati (3.2) ja 3,4 g tetrabutüülammooniumvesiniksulfaati (3.3) 1000 ml vees (3.1) ja segatakse.

3.13.2. Eluent B: atsetonitriil (3.4).

3.13.3. Eluent C: metanool (3.5).

4. Seadmed

4.1. Mehaaniline loksuti.

4.2. HPLC seadmed, mis võimaldavad kasutada kolmekomponendilist gradienti.

4.2.1. Vedelikkromatograafiakolonn 100 × 4,6 mm, täidis: Hypersil ODS, 3 µm või samaväärne.

4.2.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor.

4.3. Vaakumpöördaurusti.

4.4. Membraanfilter, 0,45 µm.

4.5. Vaakumkollektor.

4.6. Ultrahelivann.

5. Analüüsi käik

5.1. Üldosa

5.1.1. Võrdlussööt

Tuleb analüüsida võrdlussööta veendumaks, et selles ei ole ei diklasuriili ega segavaid aineid. Võrdlussööt peab olema prooviga samalaadne ja diklasuriili ega segavaid aineid ei tohi selles olla avastataval määral.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatses analüüsitakse võrdlussööta, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus diklasuriili. Et saada kontsentratsiooni 1 mg/kg, kantakse 50 g võrdlussöödale 0,1 ml põhistandardlahust (3.8.1), segatakse hoolikalt ja jäetakse 10 minutiks seisma, segades enne katse jätkamist (5.2) veel mitu korda.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatse teha standardlisandi meetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitava proovile ligikaudu sama suur diklasuriilikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Söödad

Võetakse ligikaudu 50 g proovi kaalutis täpsusega 0,01 g, pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (3.9.2) ja 200 ml ekstrahenti (3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse öö jooksul loksutil (4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 20 ml supernatandi alikvooti sobivasse klaasanumasse ja lahjendatakse 20 ml veega. Lahus kantakse ekstraktsioonihülsile (3.11) ja juhatakse sellest läbi vaakumi abil (4.5). Hülsi pestakse 25 ml ekstrahendi (3.12) ja vee seguga, 65 + 35 (ruumala järgi). Kogutud fraktsioonid visatakse ära ning elueeritakse ühendid, kasutades 25 ml ekstrahendi (3.12) ja vee segu 80 + 20 (ruumala järgi). Seda fraktsiooni aurutatakse 60 °C juures pöördaurusti (4.3) abil, kuni see saab kuivaks. Jääk lahustatakse 1,0 ml N,N-dimetüülformamiidis (3.6), lisatakse 1,5 ml vett (3.1) ja segatakse. Filtreeritakse läbi membraanfiltrit (4.4). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud

Võetakse ligikaudu 1 g proovi kaalutis 0,001 g täpsusega, pannakse 500 ml koonilisse kolbi, lisatakse 1,00 ml sisestandardlahust (3.9.3) ja 200 ml ekstrahenti (3.12) ning korgitakse kolb kinni. Segu loksutatakse öö jooksul loksutil (4.1). Lastakse 10 minutit settida. Kantakse 10 000/p ml (p = diklasuriili nominaalsisaldus eelsegus mg/kg) supernatandi alikvooti sobiva suurusega ümarkolbi. Aurutatakse pöördaurustis (4.3) alandatud rõhu ja 60 °C juures, kuni proov saab kuivaks. Jääk lahustatakse uuesti 10,0 ml N,N-dimetüülformamiidis (3.6), lisatakse 15,0 ml vett (3.1) ja segatakse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.3. HPLC määramine

5.3.1. Parameetrid

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

— Vedelikkromatograafiakolonn (4.2.1):	100 × 4,6 mm, täidis: Hypersil ODS, 3µm või samaväärne	
— Liikuv faas:	eluent A (3.13.1):	ammooniumatsetaadi ja tetrabu-tüül-ammooniumvesiniksulfaadi vesilahus
	eluent B (3.13.2):	atsetonitriil
	eluent C (3.13.3):	metanool

- Elueerimisviis:
 - lineaarne gradient
 - algtitingimused: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (ruumala järgi)
 - pärast 10 minutit gradientelueerimist 30 minutit: $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (ruumala järgi)
- Elueeritakse Bga 10 minutit
- Voolukiirus: 1,5–2 ml/min
- Injektsioonimaht: 20 µl
- Lainepikkus, mille juures määramine toimub: 280 nm

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, injekteerides korduvalt kaliibrimislahust (3.10) kontsentratsiooniga 2 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigikõrgused ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kaliibrimislahus

Injekteeritakse korduvalt kaliibrimislahust (3.10) kontsentratsiooniga 20 µl ja määratakse diklasuriili ning sisestandardi piikide keskmine kõrgus (pindala).

5.3.3. Proovilahus

Injekteeritakse korduvalt proovilahust (5.2.1 või 5.2.2) kontsentratsiooniga 20 µl ja määratakse diklasuriili ning sisestandardi piikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

6.1. Söödad

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

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \beta_{d,c} \cdot 10 \text{ V}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

kus:

- $h_{d,s}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.1)
- $h_{i,s}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.1)
- $h_{d,c}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) kaliibrimislahuses (3.10)
- $h_{i,c}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) kaliibrimislahuses (3.10)
- $\beta_{d,c}$ = diklasuriili kontsentratsioon (µg/ml) kaliibrimislahuses (3.10)
- m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)
- V = prooviekstrakti maht vastavalt punktidele 5.2.1 (s.o 2,5 ml)

6.2. Eelsegud

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

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c} \cdot \beta_{d,c} \cdot 0,02 \text{ V} \cdot p}{h_{i,s} \cdot h_{d,c} \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

kus:

- $h_{d,c}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) kaliibrimislahuses (3.10)
- $h_{i,c}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) kaliibrimislahuses (3.10)
- $h_{d,s}$ = diklasuriili piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.2)
- $h_{i,s}$ = sisestandardi piigi kõrgus (pindala) proovilahuses (5.2.2)
- $\beta_{d,c}$ = diklasuriili kontsentratsioon kaliibrimislahuses (3.10)
- m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)
- V = prooviekstrakti maht vastavalt punktidele 5.2.2 (s.o 25 ml)
- p = diklasuriili nominaalsaldus eelsegus (mg/kg)

7. Tulemuste kontrollimine

7.1. Samasus

Uuritava aine samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diodireadetektorit, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti (5.2.1 või 5.2.2) ja kaliibrimislahuse (3.10) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse

Prooviekstraktile (5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.10). Lisatud diklasuriilikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud diklasuriilikogus.

Lisatud koguse ja ekstrakti lahjenduse arvessevõtmise tulemusena peab tõusma üksnes diklasuriili piigi ja sisestandardi piigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui $\pm 10\%$ kontsentreerimata prooviekstrakti diklasuriili piigi või sisestandardi piigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diodireadetektori abil

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- a) proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema; diodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- b) lainepikkustel 230–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad kromatogrammil oleva proovi ja standardi piigi tipu spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- c) lainepikkustel 230–320 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

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

7.2. Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada:

- 30 % suuremast tulemusest diklasuriilisalduse vahemikus 0,5–2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg diklasuriilisalduse vahemikus 2,5–5 mg/kg,
- 15 % suuremast tulemusest, kui diklasuriilisaldus on suurem kui 5 mg/kg.

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga (võrdlus)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 80 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühisuuring, mille käigus analüüsiti 11 laboratooriumis viit proovi. Proovideks oli kaks eelsegu; üht oli segatud orgaanilise maatriksiga (O 100) ja teist anorgaanilise maatriksiga (A 100). Teoreetiline diklasuriilisaldus on 100 mg/kg. Kolm eri tootjat (NL) (L1/Z1/K1) valmistasid kolm kodulindude söödasegu. Teoreetiline diklasuriilisaldus on 1 mg/kg. Laboratooriumidele tehti ülesandeks iga proovi üks kord või kaks korda analüüsida. (Üksikasjalikum teavet selle ühisuuringu kohta võib leida ajakirjas Journal of AOAC International, köide 77, nr 6, 1994, lk 1359–1361.) Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

	Proov 1 A 100	Proov 2 O 100	Proov 3 L 1	Proov 4 Z 1	Proov 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Keskmine	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
sr (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CVr (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
sR (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CVR (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominaalsisaldus (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: laboratooriumide arv

n: üksikmääramiste arv

sr: korratavust iseloomustav standardhälve

CVr: korratavust iseloomustav variatsioonikoefitsient

sR: reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CVR: reprodutseeritavust iseloomustav variatsioonikoefitsient

9. Märkused

Eelnevalt peab olema näidatud, et diklasuriili piigi kõrgus (pindala) on mõõdetavas vahemikus lineaarses sõltuvuses kontsentratsioonist.

C OSA

KARBADOKSI MÄÄRAMINE

Metüül-3-(2-kinoksalinüülmetüleen)karbasaat-N¹,N⁴-dioksiid

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on karbadoksi määramiseks söötades, eelsegudes ja preparaates. Avastamiskünnis on 1 mg/kg. Määramispiir on 10 mg/kg.

2. Põhimõte

Proovil lastakse vees seista ja ekstraheeritakse metanooli ja atsetonitriili seguga. Söötade puhul lastakse filtreeritud ekstrakti alikvoodil selgida alumiiniumoksiidkolonnil. Eelsegude ja preparaate puhul lahjendatakse filtreeritud ekstrakti alikvoot vee, metanooli ja atsetonitriiliga sobiva kontsentratsioonini. Karbadoksisisaldus määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades UV-detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Metanool.

3.2. Atsetonitriil, HPLC-puhas.

3.3. Äädikhape, 100 %.

3.4. Alumiiniumoksiid: neutraalne, aktiivsuse aste I.

3.5. Metanool + atsetonitriil: 1 : 1 (ruumala järgi).

Segatakse 500 ml metanooli (3.1) 500 ml atsetonitriiliga (3.2).

3.6. Äädikhape, $\sigma = 10$ %.

Lahjendage 10 ml äädikhapet (3.3) veega 100 milliliitrini.

3.7. Naatriumatsetaat, CH₃COONa.

3.8. Vesi, HPLC-puhas.

3.9. Atsetaathapnerlahus, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Lahustatakse 0,82 g naatriumatsetaati (3.7) 700 ml vees (3.8) ja justeeritakse äädikhappega (3.6) nii, et pH oleks 6,0. Kallatakse 1000 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb veega (3.8) kuni märgini ja segatakse.

3.10. HPLC liikuv faas.

Segatakse 825 ml atsetaathapnerlahust (3.9) 175 ml atsetonitriiliga (3.2). Filtreeritakse läbi 0,22 μm filtri (4.5) ning degaseeritakse lahus (nt mõjutades ultraheliga 10 minutit).

3.11. Standardaine.

Puhas karbadoks: metüül-3-(2-kinoksalinüülmetüleen)karbasaat- N^1, N^4 -dioksiid, E850.

3.11.1. Karbadoksi põhistandardlahus, 100 $\mu\text{g/ml}$ (vt punkt 5: analüüsi käik).

Võetakse 25 mg karbadoksi standardaine (3.11) kaalutis täpsusega 0,1 mg, ja asetatakse see 250 ml mõõtekolbi. Lahustatakse ultraheliga mõjutades (4.7) metanooli ja atsetonitriili segus (3.5). Pärast ultraheliga mõjutamist viiakse lahuse temperatuur toatemperatuurini, täidetakse kolb metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi või kasutatakse tumedat anumad ja säilitatakse külmikus. Temperatuuril $\leq 4^\circ\text{C}$ säilib lahus muutumatuna ühe kuu.

3.11.2. Kaliibrimislahused

Pannakse 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 ml põhistandardlahust (3.11.1) 100 ml kaliibritud kolbidesse. Lisatakse 30 ml vett, täidetakse kolvid metanooli ja atsetonitriili seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Kolb mähitakse alumiiniumfooliumi. Need lahused sisaldavad karbadoksi vastavalt 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 $\mu\text{g/ml}$. Kaliibrimislahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

Märkus: Karbadoksi määramiseks söötades, mis sisaldavad vähem kui 10 mg/kg, tuleb valmistada kaliibrimislahused, mille kontsentratsioon on alla 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

3.12. Vesi + (metanool + atsetonitriil) (3.5), 300 + 700 (ruumala järgi)

Segatakse 300 ml vett 700 ml metanooli ja atsetonitriili (3.5) seguga.

4. Seadmed

4.1. Laboratooriumiloksuti või magnetsegur.

4.2. Klaaskiust filterpaber (Whatman GF/A või samaväärne).

4.3. Klaaskolonn (pikkus 300–400 mm, sisediaameeter ligikaudu 10 mm) paagutatud klaasfiltri ja äravooluklapiga.

Märkus: Kasutada võib ka sulgemiskraaniga või koonuseks töödeldud otsaga klaaskolonn; sel juhul pannakse kolonni alumisse otsa väike klaasvillatroppe, mis tammitakse klaaspulgaga tihedaks.

4.4. HPLC seade koos injektioonisüsteemiga, mis võimaldab injekterida 20 μl .

4.4.1. Vedelikukromatograafiakolonn, 300 × 4 mm; C18-ekstraktsioonihülss, täidis: 10 μm või samaväärne.

4.4.2. Muudetava lainepikkusega UV-detektor või diodireadetektor, mis töötab vahemikus 225–400 nm.

4.5. Membraanfilter, 0,22 μm .

4.6. Membraanfilter, 0,45 μm .

4.7. Ultrahelivann.

5. Analüüsi käik

Märkus: Karbadoks on valgustundlik. Kõik protseduurid tehakse nõrgas valguses või kasutatakse tumedat või alumiiniumfooliumi mähitud anumad.

5.1. Üldosa

5.1.1. Võrdlussööt.

Selleks, et teha saagisekatset (5.1.2), tuleb eelnevalt teha võrdlussööda analüüs veendumaks, et selles ei ole ei karbadoksi ega segavaid aineid. Võrdlussööt peab olema prooviga samalaadne ja karbadoksi ega segavaid aineid ei tohi selles olla avastataval määral.

5.1.2. Saagisekatse.

Saagisekatset analüüsitakse võrdlussööta (5.1.1), millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus karbadoksi. Et saada kontsentratsiooni 50 mg/kg, kantakse 5,0 ml põhistandardlahust (3.11.1) 200 ml koonilisse kolbi. Lahus aurutatakse lämmastikuvoolumis ligikaudu 0,5 milliliitri. Lisatakse 10 g võrdlussööta, segatakse ja jäetakse enne ekstraheerimist (5.2) asumist 10 minutiks seisma.

Juhul kui prooviga samalaadne võrdlussööt puudub (vt 5.1.1), võib saagisekatset teha standardlisandi meetodil. Sel juhul lisatakse proovile ligikaudu sama suur karbadoksikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsenteerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Söödad.

Võetakse ligikaudu 10 g proovi kaalutis täpsusega 0,01 g ja pannakse 200 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 35,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5), korgitakse kinni ja loksutatakse 30 minutit loksutil või segatakse magnetseguril (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2). See lahus säilitatakse puhastamiseks (5.3).

5.2.2. Eelsegud (0,1–2,0 %).

Võetakse ligikaudu 1 g jahvatamata proovi kaalutis täpsusega 0,01 g ja pannakse 200 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 35,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5), korgitakse kinni ja loksutatakse 30 minutit loksutil või segatakse magnetseguril (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2). Filtraadi alikvoot pipetatakse 50 ml kalibreeritud kolbi. Lisatakse 15,0 ml vett, täidetakse kolb metanooli ja atsetonitriiliga seguga (3.5) kuni märgini ja segatakse. Lõpplahuse karbadoksikontsentratsioon peaks olema ligikaudu 10 µg/ml. Alikvoot filtreeritakse läbi 0,45 µm filtri (4.6). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.2.3. Preparaadid (> 2 %)

Võetakse ligikaudu 0,2 g jahvatamata proovi kaalutis täpsusega 0,001 g ja pannakse 250 ml koonilisse kolbi. Lisatakse 45,0 ml vett, segatakse ja lastakse seista 5 minutit. Lisatakse 105,0 ml metanooli ja atsetonitriili segu (3.5), korgitakse kinni ja homogeneeritakse. Mõjutatakse ultraheliga (4.7) 15 minutit, seejärel loksutatakse või segatakse 15 minuti jooksul (4.1). Lahus filtreeritakse läbi klaaskiust filterpaberi (4.2). Filtraadi alikvoot lahjendatakse vee ning metanooli ja atsetonitriili seguga (3.12), kuni karbadoksi lõppkontsentratsioon on 10–15 µg/ml (10 % preparaadi puhul on lahjendusaste 10). Alikvoot filtreeritakse läbi 0,45 µm filtri (4.6). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.3. Puhastamine

5.3.1. Alumiiniumoksiidikoloni ettevalmistamine.

Kaalutakse 4 g alumiiniumoksiidi (3.4) ja pannakse klaaskoloni (4.3).

5.3.2. Proovi puhastamine.

Alumiiniumoksiidikoloni lisatakse 15 ml filtreeritud ekstrakti (5.2.1) ja visatakse eluaadi esimesed 2 ml ära. Järgmised 5 ml kogutakse ning filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm filtri (4.6). Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.4).

5.4. HPLC määramine

5.4.1. Parameetrid

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

Vedelikkromatograafiakolonn (4.1.1):	300 × 4 mm, C18-ekstraktsioonihülss; täidis: 10 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.10):	atsetaathapalahuse (3.9) ja atsetonitrili (3.2) segu, 825 + 175 (ruumala järgi)
Voolukiirus:	1,5–2 ml/min
Lainepikkus, mille juures määramine toimub:	365 nm
Injektsioonimaht:	20 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, injekterides korduvalt kaliibrimislahust (3.11.2) kontsentratsiooniga 5,0 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigikorgused (pindalad) ja retentsiooniajad.

5.4.2. Kaliibrimisgraafik.

Iga kaliibrimislahust (3.11.2) injekteeritakse korduvalt ja mõõdetakse igale kontsentratsioonile vastavad piigi kõrgused (pindalad). Ehitatakse kaliibrimisgraafik, kandes ordinaatteljele kaliibrimislahuste keskmised piigi kõrgused või pindalad ja abstsissiteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.4.3. Proovilahus.

Prooviekstrakti [(5.3.2) söötade, (5.2.2) eelsegude ja (5.2.3) preparaate puhul] injekteeritakse korduvalt ja määratakse karbadoksiipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

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

6.1. Söödad:

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

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

kus

β = karbadoksi kontsentratsioon (µg/ml) prooviekstraktis (5.3.2)

V_1 = võetud ekstrahendi maht, ml (s.o 50)

m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)

6.2. Eelsegud ja preparaadid.

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

$$w = \frac{\beta \times V_2 f}{m} [\text{mg/kg}]$$

kus

β = karbadoksi kontsentratsioon (µg/ml) prooviekstraktis (5.2.2 või 5.2.3)

V_2 = võetud ekstrahendi maht, ml (s.o 50 eelsegude, 150 preparaate puhul)

f = punkti 5.2.2 (eelsegud) või 5.2.3 (preparaadid) kohane lahjendusfaktor

m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)

7. Tulemuste kontrollimine

7.1. Samasus.

Uuritava aine samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil või kasutades diiodireadetektori, mille puhul võrreldakse prooviekstrakti ja 10,0 µg/ml sisaldusega kaliibrimislahuse (3.11.2) spektreid.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse.

Prooviekstraktile lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.11.2). Lisatud karbadoksikogus peab olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud karbadoksikogus.

Lisatud koguse ja ekstrakti lahjenduse arvessevõtmise tulemusena peab tõusma üksnes karbadoksipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolal kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui 10 % kontsentreerimata prooviekstrakti karbadoksipiigi laiusest.

7.1.2. Kontrollimine diiodireadetektori abil.

Tulemusi hinnatakse järgmiste kriteeriumide kohaselt:

- proovi ja standardi kromatogrammidel oleva piigi tipu spektri suurima neeldumise lainepikkused peavad analüüsiseadme lahutusvõime piires ühte langema; diiodireadetektori lahutusvõime on tavaliselt ± 2 nm;
- lainepikkustel 225–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad kromatogrammil oleva proovi ja standardi piigi tipu spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kahe spektri kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % standardainele vastavatest neeldumistest;
- lainepikkustel 225–400 nm ning suhtelise neeldumise vahemikus 10–100 % peavad prooviekstrakti piigi tõusva osa, tipu ja alaneva osa spektrid ühte langema. Seda nõuet peetakse täidetuks, kui mainitud spektrites esinevad ühed ja samad maksimumid ning erinevused kõigis uuritud punktides ei ületa 15 % piigi tipu spektri vastavatest neeldumistest.

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

7.2. Korratavus.

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi 10 mg/kg ja suuremate sisalduste puhul ületada 15 % suuremast tulemusest.

7.3. Saagis.

Suurendatud kontsentratsiooniga (võrdlus)proovi puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühisuuring, mille käigus analüüsiti 8 laboratooriumis kuut sööta, nelja eelsegu ja kolme preparaati. Iga proovi analüüsiti kaks korda. (Üksikasjalikum teavet selle ühisuuringu kohta võib leida ajakirjas Journal of AOAC International, köide 71, 1988, lk 484–490.) Tulemused (välja arvatud kõrvalekalded) on esitatud järgmises tabelis:

Tabel 1. Söödade ühisuuringu tulemused

	Proov 1	Proov 2	Proov 3	Proov 4	Proov 5	Proov 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
keskmine (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
sR (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominaalsisaldus (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabel 2. Eelsegude ja preparaaside ühisuuringu tulemused

	Eelsegud				Preparaadid		
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
keskmine (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
sR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominaalsisaldus (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: laboratooriumide arv

n: üksikmääramiste arv

sr: korratavust iseloomustav standardhälve

CVr: korratavust iseloomustav variatsioonikoeffitsient

sR: reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CVR: reprodutseeritavust iseloomustav variatsioonikoeffitsient