

31999L0076

6.8.1999

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

L 207/13

KOMISJONI DIREKTIIV 1999/76/EÜ,**23. juuli 1999,****millega kehtestatakse ühenduse analüüsimeetod naatriumlasalotsiidi määramiseks söötades****(EMPs kohaldatav tekst)**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

Artikkel 2

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 Austria, Soome ja Rootsi ühinemisaktiga), eriti selle artiklit 2,

ning arvestades, et:

- (1) direktiivis 70/373/EMÜ on ette nähtud, et söötade ametlikku kontrollimist 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 söödaliseid käsitlev direktiiv 70/524/EMÜ, ⁽²⁾ viimati muudetud komisjoni 26. aprilli 1999. aasta määrusega (EÜ) nr 866/1999, ⁽³⁾ näeb ette, et eelsegudele ja söötadele lisatud naatriumlasalotsiidi sisaldus peab olema näidatud märgistusel;
- (3) nende ainete kontrollimiseks tuleb kehtestada ühenduse analüüsimeetodid;
- (4) käesolevas direktiivis ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise söödakomitee arvamusega,

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi sätete järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 31. jaanuaril 2000. Nad teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Liikmesriigid kohaldavad neid meetmeid alates 1. veebruarist 2000.

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 3

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

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Brüssel, 23. juuli 1999

Artikkel 1

Liikmesriigid sätestavad, et söötade ja eelsegude lasalotsiidsisalduse ametlikuks kontrollimiseks korraldatavad analüüsid tehakse käesoleva direktiivi lisas ettenähtud meetodid kasutades.

Komisjoni nimel
komisjoni liige
Franz FISCHLER

⁽¹⁾ EÜT L 170, 3.8.1970, lk 2.

⁽²⁾ EÜT L 270, 14.12.1970, lk 1.

⁽³⁾ EÜT L 108, 27.4.1999, lk 20.

LISA

NAATRIUMLASALOTSIIDI MÄÄRAMINE

Polüetermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud *Streptomyces lasaliensis*'est

1. Eesmärk ja rakendusala

Käesolev meetod on naatriumlasalotsiidi määramiseks söötades ja eelsegudes. Avastamiskünnis on 5 mg/kg, määramispiir 30 mg/kg.

2. Põhimõte

Naatriumlasalotsiid ekstraheeritakse proovist hapestatud metanooliga ja määratakse pöördfaasilise kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) abil, kasutades spektrofluoromeetrilist detektorit.

3. Reaktiivid

3.1. Kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4)

3.2. Ortofosforhape, w = 85 %

3.3. Ortofosforhappelahus, $\sigma = 20$ %

23,5 ml ortofosforhapet (3.2) lahjendatakse veega 100 milliliitriini.

3.4. 6-metüül-2-heptüülamiin ehk 1,5-dimetüülheksüülamiin, w = 99 %

3.5. Metanool, HPLC-puhas

3.6. Soolhape, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.7. Fosfaatpuhverlahus, c = 0,01 mol/l

1,36 g KH_2PO_4 (3.1) lahustatakse 500 ml vees (3.11), lisatakse 3,5 ml ortofosforhapet (3.2) ja 10,0 ml 6-metüül-2-heptüülamiini (3.4). Justeeritakse ortofosforhappelahusega (3.3) nii, et pH oleks 4,0, ja lahjendatakse veega (3.11) 1 000 milliliitriini.

3.8. Hapestatud metanool

Pannakse 5,0 ml soolhapet (3.6) 1 000 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb metanooliga (3.5) kuni märgini ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.9. HPLC liikuv faas, fosfaatpuhverlahus + metanoolilahus: 5 + 95 (ruumala järgi)

5 ml fosfaatpuhverlahust (3.7) segatakse 95 ml metanooliga (3.5).

3.10. Tagatud puhtusega naatriumlasalotsiidi standardaine $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (polüetermonokarboksüülhappe naatriumsool, saadud *Streptomyces lasaliensis*'est), E763

3.10.1. Naatriumlasalotsiidi põhistandardlahus, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Võetakse 50 mg naatriumlasalotsiidi (3.10) kaalutis täpsusega 0,1 mg ja asetatakse see 100 ml mõõtekolbi, lahustatakse hapestatud metanoolis (3.8), täidetakse kolb sama lahustiga kuni märgini ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.2. Naatriumlasalotsiidi vahestandardlahus, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pipetatakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.10.1) 100 ml mõõtekolbi, täidetakse kolb hapestatud metanooliga (3.8) kuni märgini ja segatakse. See lahus tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.10.3. Kaliibrimislahus

Pannakse 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 ml vahestandardlahust (3.10.2) 50 ml mõõtekolbidesse. Kolvid täidetakse hapestatud metanooliga (3.8) kuni märgini ja segatakse. Nende lahuste naatriumlasalotsiidi sisaldus on 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lahused tuleb valmistada vahetult enne kasutamist.

3.11. Vesi, HPLC-puhas

4. Seadmed

- 4.1. Temperatuuri reguleerimise seadmetega ultrahelivann (või loksutiga veevann)
- 4.2. Membraanfiltrid, 0,45 µm
- 4.3. HPLC seade koos injektioonisüsteemiga, mis võimaldab injekteerida 20 µl
- 4.3.1. Vedelikkromatograafiaakolonn 125 × 4 mm, pöördfaasiline C18-ekstraktsioonihülss, täidis: 5 µm või samaväärne
- 4.3.2. Spektrofluorimeeter, mis võimaldab ergastuse- ja emissiooni lainepikkusi muuta

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 naatriumlasalotsiidi ega segavaid aineid. Võrdlussööt peaks olema prooviga samalaadne ja naatriumlasalotsiidi või segavaid aineid ei tohi selles olla avastataval määral.

5.1.2. Saagisekatse

Saagisekatse analüüsitakse võrdlussööt, millele on lisatud proovis oleva kogusega ligilähedane kogus naatriumlasalotsiidi. Et saada kontsentratsiooni 100 mg/kg, kantakse 10,0 ml põhistandardlahust (3.10.1) 250 ml koonilisse kolbi ja aurutatakse lahus ligikaudu 0,5 milliliitriini. Lisatakse 50 g võrdlussööt, segatakse põhjalikult 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 standardisandi meetodil. Sel juhul lisatakse analüüsitavale proovile ligikaudu sama suur naatriumlasalotsiidikogus, mis on proovis juba olemas. Seda proovi analüüsitakse koos kontsentreerimata prooviga ja saagis leitakse lahutamise teel.

5.2. Ekstraheerimine

5.2.1. Söödad

Võetakse 5–10 g proovi kaalutis täpsusega 0,01 g ja pannakse 250 ml koonilisse korgiga kolbi. Lisatakse pipetiga 100,0 ml hapestatud metanooli (3.8). Korgitakse kinni ja raputatakse segi. Kolb pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lastakse umbes 1 tund seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.2) sobivasse anumasse. Seejärel alustatakse HPLC määramist (5.3).

5.2.2. Eelsegud

Võetakse umbes 2 g jahvatamata eelsegu kaalutis täpsusega 0,001 g ja pannakse 250 ml mõõtekolbi. Lisatakse 100,0 ml hapestatud metanooli (3.8) ja raputatakse segi. Kolb koos sisuga pannakse 20 minutiks ligikaudu 40 °C ultrahelivanni (4.1), seejärel võetakse sealt välja ja jahutatakse toatemperatuurini. Lahjendatakse hapestatud metanooliga (3.8) kuni määrgini ja segatakse hoolikalt. Lastakse tund aega seista, kuni heljuv aine on settinud, siis filtreeritakse alikvoot läbi 0,45 µm membraanfiltrit (4.2). Vajalik kogus selginud filtraati lahjendatakse hapestatud metanooliga (3.8), et saada lõplik katselahus, mis sisaldab umbes 4 µg/ml naatriumlasalotsiidi. 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):

Vedelikkromatograafiaakolonn (4.3.1):	125 × 4 mm, pöördfaasiline C18-ekstraktsioonihülss, täidis: 5 µm või samaväärne
Liikuv faas (3.9):	fosfaatpuhverlahuse (3.7) ja metanooli (3.5) segu, 5 + 95 (ruumala järgi)
Voolukiirus:	1,2 ml/min
Lainepikkused, mille juures määramised toimuvad:	
– ergastus:	310 nm
– emissioon:	419 nm
Injektioonimaht:	20 µl

Kromatograafiaseadme tasakaalustatust kontrollitakse, injekteeerides korduvalt kaliibrimislahust (3.10.3) kontsentratsiooniga 4,0 µg/ml, kuni saavutatakse reprodutseeritavad piigikõrgused (või pindalad) ja retentsiooniajad.

5.3.2. Kaliibrimisgraafik

Iga kaliibrimislahust (3.10.3) injekteeeritakse korduvalt ja määratakse igale kontsentratsioonile vastavad keskmised piigikõrgused (pindalad). Ehitatakse kaliibrimisgraafik, kandes ordinaatteljele keskmised piigi kõrgused (pindalad) ja abstsisssteljele vastavad kontsentratsioonid (µg/ml).

5.3.3. Proovilahus

Injekteeritakse punktide 5.2.1 või 5.2.2 kohaselt saadud prooviekstrakte korduvalt samas mahus mis kaliibrimislahuse puhul ja määratakse naatriumlasalotsiidipiikide keskmine kõrgus (pindala).

6. Tulemuste arvutamine

Proovilahuse (5.3.3) injekteeerimisega saadud piikide keskmise kõrguse (pindala) alusel leitakse kaliibrimisgraafiku abil naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon (µg/ml).

6.1. Söödad

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

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

kus:

β = naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon (µg/ml) proovilahuses (5.2.1)

V_1 = vastavalt punktidele 5.2.1 prooviekstrakti maht milliliitrites (s.o 100)

m = analüüsiks võetud proovi kaalutis (g)

6.2. Eelsegud

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

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

kus:

β = naatriumlasalotsiidi kontsentratsioon (µg/ml) proovilahuses (5.2.2)

V_2 = vastavalt punktidele 5.2.2 prooviekstrakti maht milliliitrites (s.o 250)

f = punkti 5.2.2 kohane lahendusfaktor

7. Tulemuste kontrollimine

7.1. Samasus

Spektrofluoromeetriselised meetodid on vähem tundlikud kõrvaliste lisandite suhtes kui UV-meetodid. Analüüsitava proovi samasust saab kinnitada täiendava kromatograafiakatse abil.

7.1.1. Täiendav kromatograafiakatse

Prooviekstraktile (5.2.1 või 5.2.2) lisatakse vajalik kogus kaliibrimislahust (3.10.3). Lisatud naatriumlasalotsiidi-kogus peaks olema ligikaudu sama suur nagu prooviekstraktist leitud naatriumlasalotsiidi kogus. Lisatud koguse ja ekstrakti lahenduse arvessevõtmise tulemusena peab tõusma üksnes naatriumlasalotsiidipiigi kõrgus. Piigi laius selle poolel kõrgusel ei tohi erineda rohkem kui ± 10 % kontsenteerimata prooviekstrakti naatriumlasalotsiidipiigi laiusest.

7.2. Korratavus

Sama prooviga tehtud kahe paralleelse määramise tulemuste erinevus ei tohi ületada

— 15 % suurimast tulemusest naatriumlasalotsiidi sisalduse vahemikus 30–100 mg/kg,

— 15 mg/kg naatriumlasalotsiidi sisalduse vahemikus 100–200 mg/kg,

— 7,5 % suurimast tulemusest, kui naatriumlasalotsiidi sisaldus on suurem kui 200 mg/kg.

7.3. Saagis

Suurendatud kontsentratsiooniga söödaproovi (võrdlusproovi) puhul peab saagis olema vähemalt 80 %. Suurendatud kontsentratsiooniga eelseguproovi (võrdlusproovi) puhul peab saagis olema vähemalt 90 %.

8. Ühisuuringu tulemused

Korraldati ühisuuring, ⁽¹⁾ mille käigus analüüsiti 12 laboratooriumis kahte eelsegu (proovid 1 ja 2) ja viit sööta (proovid 3–7). Iga proovi analüüsiti kaks korda. Tulemused on esitatud järgmises tabelis:

⁽¹⁾ Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

	Proov 1 Eelsegu kanade jaoks	Proov 2 Eelsegu kalkunite jaoks	Proov 3 Graanulid kalkunite jaoks	Proov 4 Purus- tatud graanulid kanade jaoks	Proov 5 Kalkunite sööt	Proov 6 Linnusööt A	Proov 7 Linnusööt B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Keskmine (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nominaalsisaldus (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (†)	35 (†)

L = laboratooriumide arv

N = üksikmääramiste arv

s_r = korratavust iseloomustav standardhälve

s_R = reprodutseeritavust iseloomustav standardhälve

CV_r = korratavust iseloomustav variatsioonikoefitsient, %

CV_R = reprodutseeritavust iseloomustav variatsioonikoefitsient, %

(*) tootja deklareeritud sisaldus

(†) laboratooriumis valmistatud sööt