31993L0070

IL-ĦDAX ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI 93/70/KEE

tat-28 ta' Lulju 1993

li tistabbilixxi l-metodi ta' l-analiżi Komunitarji għall-kontroll uffiċjali ta' l-għalf

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kunsidrat t-Trattat li jistabbilixxi l-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 70/373/KEE of 20 Lulju 1970 rigward l-introduzzjoni ta' metodi tal-Komunità dwar l-ikkampjunar u l-analiżi għal kontroll uffiċjali ta' materjali ta' l-għalf [1], kif l-aħħar emedata bir-Regolamenti (KEE) Nru 3768/85 [2], u partikolarment l-Artikolu 2 tiegħu,

Billi d-Direttiva 70/373/KEE teħtieġ li l-kontrolli uffiċjali fuq il-materjali ta' l-għalf għall-iskop tal-verifika tal-konformità mal-ħtiġiet li joriġinaw permezz tad-dispożizzjonijiet tal-kwalità u l-kompożizzjoni kif stabbilit bil-liġi, bir-regolamenti jew b'azzjoni amministrattiva għandhom ikunu mwettqa bl-użu tal-metodi tal-kampjunar u ta' l-analiżi tal-Komunità;

Billi l-metodi ta' l-analiżi tal-Komunità rigward l-addittiv halofuginone għandhom ikunu stabbiliti għall-użu fil-verifika tal-konformità mal-kondizzjonijiet għall-użu tagħhom fil-materjali ta' l-għalf ta' l-annimali;

Billi l-miżuri li hemm provvediment dwarhom f'din id-Direttiva huma bi qbil ma l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti dwar il-materjali ta' l-għalf,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

L-Istati Membri għandhom jeħtieġu li l-analiżi mwettqa għall-kontenut ta' halofuginone għall-iskopijiet tal-verifiki uffiċjali fuq il-materjali ta' l-għalf għandhom isiru bl-użu tal-metodi deskritti fl-Anness t'hawnhekk.

Artikolu 2

L-Istati Membri għandhom idaħħlu fis-seħħ il-liġijiet, ir-regolamenti w id-dispożizzjonijiet amministrattivi meħtieġa sabiex ikunu konformi din id-Direttiva sat-30 ta' Ġunju 1994. Huma għandhom immedjatament jinfurmaw b'dan lill-Kummissjoni.

Meta l-Istati Membri jadottaw dawn id-dispożizzjonijiet, dawn għandhom ikollhom referenza għal din id-Direttiva jew għandhom ikunu akkumpanjati b'riferenza bħal din fil-ħin tal-pubblikazzjoni uffiċjali tagħhom. Il-proċedura għal din ir-riferenza għandha tiġi adottata mill-Istati Membri.

Artikolu 3

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmulha fi Brussell, fit-28 ta' Lulju 1993.

Għall-Kummissjoni

René STEICHEN

Membru tal-Kumissjoni

[1] ĠU L 170, tat-3.8.1970, p. 2.
[2] ĠU L 362, tal-31.12.1985, p. 8.

L-ANNESS

DETERMINAZZJONI TAL-HALOFUGINONE

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-ġ3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonylħ-quinazolin-4-(3H)-one hydrobromide

1. **Għan u skop**

Dan il-metodu huwa għad-determinazzjoni ta' halofuginone fil-materjali ta' l-għalf. Il-limitu l-aktar baxx tad-determinazzjoni huwa 1 mg/kg.

2. **Prinċipju**

Wara t-trattament bl-ilma sħun, il-halofuginone jiġi estratt bhala bażi libera fl-aċitat ta' l-etil u sussegwentement imqassam bhall-idrokloru f'soluzzjoni akweja aċiduża. Dan l-estratt jiġi ppurifikat bi kromotografia tal-iskambju tal-jonji. Il-kontenut tal-halofuginone huwa ddeterminat bil-fażi-maqluba ta' mġieba-għolja ta' kromatografija likwida (HPLC/MGKL) bl-użu ta' detettur UV.

3. **Reaġenti**

3.1. Aċetonitril, tal-grad HPLC

3.2. Amberlit XAD-2 reżina

3.3. L-aċitat ta' l-Ammonju

3.4. L-aċitat etiliku

3.5. Aċidu aċetikum glaċċjali

3.6. Sustanza standard tal-halofuginone (DL-trans-7-brome-6-chloro-3-ġ3-hydroxy-2-piperidyl)acetonylħ quinazoline-4-(3H)-one hydrobromide, E 764)

3.6.1. Taħlita standard tal-ħażna tal-halofuginone, 100 mg/ml

Iżen sa' l-eqreb 0,1 mg, 50 mg ta' halofuginone (3.6) f'garafina ggradwata ta' 500 ml, dewweb f'soluzzjoni mewwieta ta' l-aċitat ta' l-ammonju (3.18), żid sal-marka bis-soluzzjoni mewwieta u ħawwad. Din it-taħlita tibqa stabbli għal tliet ġimgħat f'5 °C jekk merfugħa fid-dlam.

3.6.2. Soluzjonijiet tal-kalibrazzjoni

F'serje ta' garafini kkalibrati ta' 100 ml, ittrasferixxi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 ml tas-soluzzjoni standard tal-ħażna (3.6.1). Wassal sal-marka bil-fażi mobbli (3.21) u ħawwad. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom konċentrazzjonijiet ta' 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 u 6,0 mg/ml tal-halofuginone rispettivament. Dawn is-soluzzjonijiet għandhom ikunu ppreparati friski qabel l-użu.

3.7. Aċidu Idrokloriku (r20 bejn wieħed w-ieħor 1,16 g/ml).

3.8. Metanol

3.9. Nitrat tal-fidda

3.10. Askorbat tas-sodju

3.11. Karbonat tas-sodju

3.12. Klorid tas-sodju

3.13. EDTA (aċidu ehtylenediaminetetraacetic, melħ disodium)

3.14. Ilma, grad HPLC

3.15. Soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju, v = 10 g/100 ml

3.16. Soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju mimli bil-klorid, v = 5 g/100 ml

Dewweb 50 g tal-karbonat tas-sodju (3.11) fl-ilma, rattab sa 1 l u żid bil-klorur tas-sodju (3.12) sakemm is-soluzzjoni tkun mifquha.

3.17. Aċidu idrokloriku, bejn wieħed w-ieħor 0,1 mol/l

Dewweb 10 ml ta' HCI (3.7) bl-ilma sa 1 l.

3.18. Soluzzjoni mewwieta ta' l-aċitat ta' l-ammonju, bejn wieħed w-ieħor 0,25

Dewweb 19,3 g ta' l-aċitat ta' l-ammonju (3.3) u 30 ml ta' aċidu aċetiku (3.5) fl-ilma (3.14) u rattab sa 1 l.

3.19. Preparazzjoni ta' amberlite XAD-2 reżina

Aħsel kwantità xierqa ta' Amberlite (3.2) bl-ilma sakemm il-joni tal-klorur kollha jitneħħew, kif indikat bit-test tan-nitrat tal-fidda (3.20) magħmul fuq il-faži akweja mwarrba. Imbagħad aħsel ir-reżina bi 50 ml metanol (3.8), armi l-metanol u żomm ir-reżina taħt il-methanol frisk.

3.20. Soluzzjoni tan-nitrat tal-fidda, bejn wieħed w-ieħor 0,1 mol/l

ĦDewweb 0,17 g ta' nitrat tal-fidda (3.9) f'10 ml ilma.

3.21. **HPLC Faži mobbli**

Ħallat 500 ml aċetronil (3.1) ma 300 ml ta' soluzzjoni mewwieta ta' l-aċetat ta' l-ammonju (3.18) u 1 200 ml ta' l-ilma (3.14). Aġġusta l-pH għal 4,3 billi tuża l-aċidu aċetiku (3.5). Għaddi minn filtru ta' 0,22 mm (4.8) u neħħi l-gass mis-soluzzjoni (e.g. permezz ta' l'ultrasonifikazzjoni għal 10 minuti). Din is-soluzzjoni hija stabbli għal xahar, jekk maħżunha fid-dlam f'reċipjent magħluq.

4. **Apparat**

4.1. Banju ultrasoniku

4.2. Evaporatur rotanti bil-pellikola

4.3. Ċentrifuga

4.4. Tgħamir HPLC b'apparat sejjiebi varjabbli tal-wavelength ultra-vjola jew sejjiebi tas-serbut tad-dijodi

4.4.1. Kolonna likwida kromatografika, imballaġġ ta' 300 mm × 4 mm, C 18, 10 mm, jew kolonna ekwivalenti

4.5. Kolonna tal-ħġieġ (300 mm × 10 mm) mgħammra b'filtru tal-ħġieġ sileċju bi stopcock

4.6. Filtri tal-fibra tal-ħġieġ, b'dijametru ta' 150 mm

4.7. Filtri tal-membranja, 0,45 mm

4.8. Filtri tal-membranja, 0,22 mm

5. **Proċedura**

Nota: Il-halofuginone bhala l-bażi libera hu instabbli fis-soluzzjonijiet alkalini u ta' l-aċitat etiliku. M'għandux jibqa fl-aċitat etiliku għal iżjed minn 30 minuta.

5.1. **Ġenerali**

5.1.1. Forniment fil-bjank għandu jkun analizzat għall-verifika li la l-halofuginone u l-anqas is-sustanzi interferenti ma jkunu preżenti.

5.1.2. Test ta' l-irkupru għandu jkun imwettaq bl-analiżi tal-forniment fil-bjank li jkun ġie msaħħaħ biż-żieda ta' kwantità ta' halofuginone, simili għal dak preżenti fil-kampjun. Bix ikun imsaħħaħ sa livell ta' 3 mg/kg, żid 300 ml tas-soluzzjoni tal-ħażna standard (3.6.1) sa 10 g tal-forniment fil-bjank, ħawwad u stenna għal 10 minuti qabel ma tipproċiedi bil-pass ta' l-estrazzjoni (5.2).

Nota: għall-iskop ta' dan il-metodu, il-forniment fil-bjank għandu jkun simili fit-tip għal dak tal-kampjun u ma l-analiżi l-halofuginone m'għandux ikun misjub.

5.2. **Estrazzjoni**

Iżen sa' l-eqreb 0,1 g, 10 g mill-kampjun ippreparat, ġewwa tubu ċentrifugu tal-200 ml, żid 0,5 g ta' l-askorbat tas-sodju (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) u 20 ml ilma u ħawwad. Qiegħed it-tubu għal 5 minuti f'banju bl-ilma (80 °C). Wara li jibred għat-temperatura tal-kamra, żid 20 ml ta' taħlita tal-karbonat tas-sodju (3.15) u ħawwad. Immedjetament żid 100 ml ta' l-aċitat etiliku (3.4) u ċaqlaq vigorożament bl-idejn għal 15 il-sekonda. Imbagħad qiegħed it-tubu għal tliet minuti fil-banju ultrasoniku (4.1) u ħoll ftit it-tapp. Iċċentrifuga għal żewġ minuti u ferra l-faži ta' l-aċitat etilku minn ġo filtru tal-fibra tal-ħġieġ (4.6), għal ġo lembut li jissepara ta' 500 ml. Irrepeti l-estrazzjoni tal-kampjun bit-tieni porzjoni ta' 100 ml ta' l-aċitat etilku. Aħsel l-estratti miġmugħa għal minuta b'50 ml ta' taħlita tal-karbonat tas-sodju imxarrab bil-bis-soluzzjoni tal-karbonat tas-sodju (3.16) u armi s-saff akweju.

Neħħi s-saff organiku għal min bi 50 ml ta' aċidu idrokloriku (3.17). Għaddi s-saff aċiduż il-baxx għal ġo lembut li jissepara ta' 250 ml. Erġa neħħi s-saff organiku għal 1,5 minuti b'50 ml ieħor ta' aċidu idrokloriku u għaqad ma' l-ewwel estratt. Aħsel l-estratti mgħaqqad billi ddawwar għal bejn wieħed u ieħor 10 sekondi ma 10 ml ta' l-aċitat etiliku (3.4).

Ittrasferixxi b'mod kwantitattiv is-saff akweju għal ġo garafina b'qiegħ tond u armi l-faži organika. Evapora l-aċitat etiliku kollu li jkun baqgħa mit-taħlita aċiduża bl-użu ta' l-evaporatur bil-pelikola rotanti (2.4). It-temperatura tal-banju bl-ilma m'għandiex teċċedi l-40 °C. Taħt vakwu ta' bejn wieħed u ieħor of 25 mbar l-aċitat etiliku kollu li jifdal għandu jkun imneħħi fi żmien ħames minuti fi 38 °C.

5.3. **Tindifa**

5.3.1. Preparazzjoni tal-kolonna ta' l-Amberlit

Kolonna XAD-2 tiġi ppreparata għal kull estratt tal-kampjun. Ittrasferixxi 10 g ta' l-Amberlit ippreparat (3.19) għal ġo kolonna tal-ħġieġ (4.5) bil-metanol (3.8). Żid feles żgħir tas-suf tal-ħġieġ ma-wiċċ tas-sodda tar-reżina. Battal il-metanol mill-kolonna u aħsel ir-reżina bi 100 ml ilma, filwaqt li twaqqaf in-nixxija ħekk kif il-likwidu jilħaq il-parti tal-wiċċ tas-sodda tar-reżina. Ħalli l-kolonna tkun ekwilibrata għal-10 minuti qabel l-użu. Qatt tħalli l-kolonna tixxotta.

5.3.2. Tindif tal-kampjun

Ittrasferixxi l-estratt (5.2) b'mod kwantitattiv lejn il-wiċċ tal-kolonna ta' l-Amberlit ippreparat (5.3.1) u saffi, twarrab it-tisfija. Ir-rata tat-tsfija m'għadniex teċċedi l-20 ml/min. Laħlaħ il-garafina tal-qiegħ tond b'20 ml aċidu idrokloridu (3.17) u uża dan biex tlaħlaħ il-kolonna tar-reżina. Onfoħ il-barra b'nixxiegħa ta' arja xi taħlita aċiduża li tkun baqgħet. Armi dak il-ħasil. Żid 100 ml metanol (3.8) mal-kolonna u ħalli 5 sa 10 ml tal-ħasil, filwaqt li tiġbor is-soluzzjoni tal-ħasil f'garfina bil-qiegħ tond ta' 250 ml. Ħalli l-metanol li jkun baqgħa jekwillibra mar-reiżina għal 10 minuti u kompli t-tlaħlieħ b'rata li ma teċċedix l-20 ml/min, u iġbor it-tlaħlieħ fl-istess garfina tal-qiegħ tond. Evapora l-metanol fuq l-evaporatur tal-pellikola rotanti (4.2), it-temperatura tal-banju ta' l-ilma m'għandiex teċċedi l-40 °C. Ittrasferixxi il-fdal b'mod kwantitattivament għal ġo garafina ikkalibrata ta' 10 ml billi tuża l-faži mobbli (3.21). Wassal sal-marka bil-faži mobbli u ħawwad. Alikwot huwa ffiltrat minn ġo filtru tal-membrana (4.7). Aħżen din is-soluzzjoni għal determinazzjoni HPLC (5.4).

5.4. **Determinazzjoni tal-HPLC**

5.4.1. Parametri

Il-kondizzjonijiet li ġejjin huma ofruti bħala gwida, kondizzjonijiet oħrajn jistgħu jkunu wżati basta li dawn jagħtu riżultati ekwivalenti:

Kolonna kromatografika likwida (4.4.1),

Faži mobbli HPLC (3.21),

Rata tan-nixxija: 1,5 sa 2 ml/min.

Sejbien tal-wavelength: 243 nm

Volum ta' l-injezzjoni: 40 sa 100 ml.

Ivverifika l-istabbilità tas-sistema kromatografika, bl-injezzjoni tas-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.6.2) li jkun fiha għal diversi drabi 3,0 mg/ml, sakemm qċaċet ta' għoljiet kostanti jew iż-żoni u ż-żmien tar-retenzjoni jkunu milħuqa.

5.4.2. Graff ta'l-kalibrazzjoni

Injetta għal kull soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.6.2) bosta drabi u kejjel il-qċaċet għoljin (żoni) għal kull konċentrazzjoni. Pinġi l-kurva tal-kalibrazzjoni bl-użu tal-medja tal-quċċata ta' l-għoljiet jew iż-żoni tas-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni bħala l-ordinati u l-konċentrazzjonijiet korresspondenti fi mg/ml bħal ma ġġall-abscissae.

5.4.3. Soluzzjoni tal-kampjun

Injetta l-estratt tal-kampjun (5.3.2) diversi drabi, billi tuża l-istess volum bħal dak meħud għas-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni u iddetermina il-medja ta' l-għoli tal-quċċata (iż-żona) tal-qċaċet tal-halofuginone.

6. **Kalkolazzjoni tar-riżultati**

Iddetermina l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun fi mg/ml, mill-medja ta' l-għoli (żona) tal-qċaċet tas-soluzzjoni tal-kampjun tal-halofuginone bis-soluzzjoni tal-kampjun b'referenza għall-grafika tal-kalibrazzjoni (5.4.2).

Il-kontenur tal-halofuginone w (mg/kg) fil-kampjun huwa mogħti b'din il-formula li ġejja:

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

li fiha:

c: konċentrazzjoni tal-halofuginone tas-sokuzzjoni tal-kampjun fi mg/ml,

m: massa tal-porzjon tat-test fi grammi.

7. **Validazzjoni tar-riżultati**

7.1. **Identità**

L-identità ta' l-analit tista tkun ikonfermata bil-ko-kromatografija, jew bl-użu ta' l-apparat tas-sejbien tas-serbut tat-diodi li bih l-ispekra ta' l-estratt tal-kampjun u s-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.6.2) li jkun fiha 6,0 mg/ml huma mqabbla.

7.1.1. Ko-kromatografija

L-estratt tal-kampjun huwa msaħħaħ biż-żieda ta' ammont xieraq tas-soluzzjoni tal-kalibrazzjoni (3.6.2). L-ammont ta' halofuginone miżjud għandu jkun simili għal-ammont ikkalkolat ta' halofuginone misjub fl-estratt tal-kampjun.

L-għoli biss tal-halofuginone miżjud għandu jkun imsaħħaħ wara li jittieħed akkont kemm ta' l-ammont miżjud u tat-trattib ta' l-estratt. Il-wisa tal-quċċata, f'nofs l-għoli masimu, għandha tkun madwar ± 10 % tal-wisa oriġinali.

7.1.2. Sejbien tas-serbut tat-diodi

Ir-riżultati huma evalutati skond il-kriterja li ġejja:

(a) il-wavelength tat-telfien massimu tal-kampjun u ta' l-ispctra standard, irreġistrati fl-apiċe tal-quċċata fuq il-kromatogramma, għandhom ikunu fl-istess fil-marġini ddeterminata mill-qawwa tar-riżoluzzjoni tat-sistema tas-sejbien. Għas-sejbien tas-serbut tad-diodi, din hija tipikament fi ħdan ± 2 nm;

(b) bejn 225 u 300 nm, il-kampjun u l-ispectra standard irreġistrati fl-apiċe tal-quċċata fuq il-kromatogramma, m'għandhomx ikunu differenti minn dawk il-partijiet ta' l-spectrum fi ħdan il-medda ta' 10 sa 100 % tat-telfien relattiv, Din il-kriterja tkun milħuqha meta l-istess massima tkun preżenti u bl-ebda punt osservat tad-devjazzjoni bejn iż-żewġ spectra ma jeċċedi 15 % tat-telfien ta' l-anilit standard;

(ċ) bejn 225 u 300 nm, l-ispectra tar-rampa l-fuq, l-apiċe u r-rampa l-isfel tal-quċċata prodotta bl-estratt tal-kampjun m'għandha tkun differenti minn kull wieħed minn dawk il-partijiet ta' l-ispectrum fi ħdan il-medda 10 sa 100 % tat-telfien relattiv. Din il-kriterja hija milħuqa meta l-istess massima tkun preżenti u meta l-punti kollha osservati tad-devjazzjoni bejn l-ispectra ma jkunu jeċċedu 15 % tat-telfien ta' l-ispectrun ta' l-apiċe.

Jekk waħda minn dawn il-kriterji ma tkunx miħuqha, il-preżenza ta' l-analit ma tkunx ġiet ikkonfermata.

7.2. **Repetabbilità**

Id-differenza bejn ir-riżultati taż-żewġ determinazzjonijiet paralelli mwettqa fuq l-istess kampjun m'għandhomx jeċċedu 0,5 mg/kg għal kontenut tal-halofuginone sa 3 mg/kg.

7.3. **Irkupru**

Għal kampjun imsaħħaħ fil-bjank l-irkupru għandu jkun mill-anqas ta' 80 %.

8. **Ir-riżultati ta' studju kollaborattiv**

Studju kollaborattiv [1] kien ġie rranġat li fih tliet kampjuni kienu analizzati minn tmien laboratorji.

Riżultati

	Kampjun A (Imbjank) mal-wasla	Kampjun B (Smida)		Kampjun C (Pritkuni)	
		Mal-wasla	Wara xahrejn	Mal-wasla	Wara xahrejn
Medja [1]	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
Rek.		86	74	88	75

([1]): unitajiet f'mg/kg
n.d.: mhux immarkat
S_R: id-devjazzjoni standard tar-riproduccibbiltà
CV_R: il-koefficcjent tal-varjazzjoni (%)
rec.: irkuprar (%)

([1]) The Analyst 108, 1983, pp. 1252 sa 1256.