31993L0070

17.9.1993 *URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI* L 234/17

ENAJSTA DIREKTIVA KOMISIJE 93/70/EGS
z dne 28. julija 1993
o določitvi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analiz Skupnosti za uradni nadzor krme ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (EGS) št. 3768/85 ([2]), in zlasti člena 2 Direktive,

ker Direktiva 70/373/EGS zahteva uradni nadzor krme, da se preveri usklajenost z zahtevami, ki izhajajo iz določb o kakovosti in sestavi, določenih z zakonom ali drugim predpisom, kar se mora izvesti z uporabo metod vzorčenja in analiz Skupnosti;

ker je treba določiti analitsko metodo Skupnosti za dodatek halofuginon za preverjanje skladnosti s pogoji njegove uporabe za prehrano živali;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zahtevajo, da se analize vsebnosti halofuginona za uradno preverjanje krme opravijo po metodi, opisani v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, do 30. junija 1994. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 28. julija 1993

Za Komisijo
René STEICHEN
Član Komisije

([1]) UL L 170, 3.8.1970, str. 2.
([2]) UL L 362, 31.12.1985, str. 8.

PRILOGA

DOLOČANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-kvinazolin-4-(3H)-ena hidrobromid

1. Namen in področje uporabe

Metoda omogoča določanje halofuginona v krmi. Spodnja meja določanja je 1 mg/kg.

2. Princip

Po obdelavi z vročo vodo halofuginon ekstrahiramo v obliki proste baze v etilni acetat in jo nato ločimo kot hidroklorid v vodno raztopino kisline. Ekstrakt prečistimo z ionsko izmenjalno kromatografijo. Vsebnost halofuginona določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in z UV-detektorjem.

3. Reagenti

3.1 Acetonitril, za HPLC

3.2 Izmenjevalec amberlit XAD-2

3.3 Amonijev acetat

3.4 Etilni acetat

3.5 Ledocetna kislina

3.6 Standardna substanca halofuginon (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-hidroksi-2-piperidil)acetonil]-kvinazolin-4-(3H)-ena hidrobromid, E 764)

3.6.1 Osnovna standardna raztopina halofuginona, 100 µg/ml

50 mg halofuginona (3.6) natehtamo s točnostjo 0,1 mg v 500 ml merilno bučko in ga raztopimo v raztopini amonacetatnega pufra (3.18), dopolnimo s pufrsko raztopino do oznake in premešamo. Raztopina je stabilna tri tedne pri 5 °C, če jo hranimo v temi.

3.6.2 Raztopine za umerjanje

V serijo 100 ml merilnih bučk prenesemo 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 in 6,0 ml osnovne standardne raztopine (3.6.1). Do oznake dopolnimo z mobilno fazo (3.21) in premešamo. Te raztopine imajo koncentracije 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 in 6,0 µg/ml halofuginona. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

3.7 Klorovodikova kislina (ρ_{20} približno 1,16 g/ml)

3.8 Metanol

3.9 Srebrov nitrat

3.10 Natrijev askorbat

3.11 Natrijev karbonat

3.12 Natrijev klorid

3.13 EDTA (etilendiamintetraocetna kislina, dinatrijeva sol)

3.14 Voda za HPLC

3.15 Raztopina natrijevega karbonata, σ = 10 g/100 ml

3.16 Raztopina nasičenega natrijevega klorida in natrijevega karbonata, σ = 5 g/100 ml

50 g natrijevega karbonata (3.11) raztopimo v vodi, razredčimo do 1 l in dodamo natrijev klorid (3.12), dokler raztopina ni nasičena.

3.17 Klorovodikova kislina, približno 0,1 mol/l

10 ml HCl (3.7) razredčimo z vodo do 1 l.

3.18 Raztopina amonacetatnega pufra, približno 0,25

Raztopimo 19,3 g amonijevega acetata (3.3) in 30 ml ocetne kisline (3.5) v vodi (3.14) ter razredčimo do 1 l.

3.19 Priprava izmenjevalca amberlita XAD-2

Ustrezno količino amberlita (3.2) spiramo z vodo, dokler niso odstranjeni vsi kloridni ioni, kar dokazuje preskus s srebrovim nitratom (3.20) v zavrženi vodni fazi. Nato speremo izmenjevalec s 50 ml metanola (3.8), tega zavržemo in izmenjevalec hranimo v svežem metanolu.

3.20 Raztopina srebrovega nitrata, približno 0,1 mol/l

Raztopimo 0,17 g srebrovega nitrata (3.9) v 10 ml vode.

3.21 Mobilna faza HPLC

500 ml acetonitrila (3.1) zmešamo s 300 ml pufrske raztopine amonijevega acetata (3.18) in 1 200 ml vode (3.14). pH naravnamo na 4,3 z uporabo ocetne kisline (3.5). Filtriramo skozi 0,22 µm filter (4.8) in razplinimo raztopino (npr. deset minut v ultrazvočni kopeli). Raztopina je stabilna en mesec, če jo hranimo na temnem v zaprti posodi.

4. **Oprema**

4.1 Ultrazvočna kopel

4.2 Rotacijski uparjalnik

4.3 Centrifuga

4.4 Oprema HPLC z ultravijoličnim detektorjem z nastavitvijo valovne dolžine ali detektorjem s serijo diod.

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm × 4 mm, C 18, polnitev 10 µm ali enakovredna kolona

4.5 Steklena kolona (300 mm X 10 mm) s filtrom iz sintranega stekla in petelinčkom

4.6 Filtri iz steklenih vlaken premera 150 mm

4.7 Membranski filtri 0,45 µm

4.8 Membranski filtri 0,22 µm

5. **Postopek**

Opomba: Halofuginon kot prosta baza je nestabilen v alkalnih in etil acetatnih raztopinah. V etil acetatu ga ne smemo pustiti več kakor 30 minut.

5.1 Splošno

5.1.1 Analizirati moramo slepo krmo, da preverimo, ali nista prisotna niti halofuginon niti moteče snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo jo obogatili z ustrezno količino halofuginona, podobno količini v vzorcu. Za obogatitev na 3 mg/kg dodamo desetim gramom slepe krme 300 µl osnovne standardne raztopine (3.6.1), premešamo in počakamo 10 minut, preden začnemo postopek ekstrakcije (5.2).

Opomba: Pri tej metodi mora biti vrsta slepe krme podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati halofuginona.

5.2 Ekstrakcija

V 200-ml centrifugirno epruveto natehtamo s točnostjo 0,1 g 10 g pripravljenega vzorca, dodamo 0,5 g natrijevega askorbata (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) in 20 ml vode ter premešamo. Epruveto postavimo za 5 min v vodno kopel (80 °C). Po ohladitvi na sobno temperaturo dodamo 20 ml raztopine natrijevega karbonata (3.15) in premešamo. Takoj nato dodamo 100 ml etil acetata (3.4) in 15 sekund ročno močno stresamo. Nato epruveto postavimo za tri minute v ultrazvočno kopel (4.1) in zrahljamo zamašek. Centrifugiramo dve minuti in oddekantiramo fazo etilen acetata skozi filter iz steklenih vlaken (4.6) v 500-ml lij ločnik. Ponovimo ekstrakcijo vzorca z drugo 100-ml porcijo etil acetata. Sestavljene ekstrakte spiramo eno minuto s 50 ml raztopine nasičenega natrijevega klorida-natrijevega karbonata (3.16) in zavržemo vodno plast.

Organsko plast ekstrahiramo 1 minuto s 50 ml klorovodikove kisline (3.17). Spodnjo kislinsko plast spustimo v 250-ml lij ločnik. Ponovno ekstrahiramo organsko plast 1,5 minute z nadaljnjimi 50 ml klorovodikove kisline in ekstrakt združimo s prvim ekstraktom. Združena ekstrakta približno 10 sekund spiramo z 10 ml etil acatata (3.4) z vrtenjem.

Kvantitativno prenesemo vodno plast v 250-ml bučko z okroglim dnom in zavržemo organsko fazo. Uparimo ves preostali etil acetat iz kisle raztopine v rotacijskem uparjalniku (2.4). Temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40 °C. Ves preostali etil acetat odstranimo v vakuumu pri približno 25 mbarih in 38 °C v 5 minutah.

5.3 Čiščenje vzorca

5.3.1 Priprava kolone z amberlitom

Kolono XAD-2 pripravimo za vsak ekstrakt vzorca. Z metanolom (3.8) prenesemo 10 g pripravljenega amberlita (3.19) v stekleno kolono (4.5). Na vrh posteljice izmenjevalca položimo majhen zamašek iz steklene volne. Metanol izpustimo iz kolone in izmenjevalec speremo s 100 ml vode tako, da tok vode ustavimo, ko vrh posteljice doseže izmenjevalec. Pustimo, da se kolona uravnoteži, ali pred uporabo počakamo 10 minut. Nikoli ne smemo dopustiti, da se kolona izsuši.

5.3.2 Čiščenje vzorca

Ekstrakt (5.2) kvantitativno prenesemo na vrh pripravljene amberlitne kolone (5.3.1) in eluiramo, tako da eluat zavržemo. Hitrost eluiranja ne sme biti večja od 20 ml/min. Bučko z okroglim dnom speremo z 20 ml klorovodikove kisline (3.17) in le-to uporabimo za spiranje izmenjalne kolone. Kakršno koli preostalo raztopino kisline prepihamo z zrakom. Ostanek po izpiranju zavržemo. V kolono dodamo 100 ml metanola (3.8) in eluiramo 5 do 10 ml v 250-ml bučko z okroglim dnom. Preostali metanol pustimo 10 minut, da se uravnoteži z izmenjevalcem, in nadaljujemo eluiranje s hitrostjo, ki ni večja od 20 ml/min, s tem da eluat lovimo v isto bučko. Metanol uparimo na rotacijskem uparjalniku (4.2), pri čemer temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40 °C. Ostanek kvantitativno prenesemo z mobilno fazo (3.21) v 10-ml merilno bučko. Dopolnimo do oznake z mobilno fazo in premešamo. Alikvot prefiltriramo skozi membranski filter (4.7). Raztopino shranimo za določitev HPLC (5.4).

5.4 Določitev HPLC

5.4.1 Parametri

Naslednji pogoji so dani kot vodila, uporabimo lahko druge pogoje, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)

Mobilna faza HPLC (3.21)

Hitrost pretoka: 1,5 do 2 ml/min

Valovna dolžina detekcije: 243 nm

Volumen vbrizga: 40 do 100 µl

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizganjem raztopine za umerjanje (3.6.2), ki vsebuje 3,0 µg/ml, dokler niso dosežene stalne višine (ali površine) vrhov in retenzijskih časov.

5.4.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umerjanje (3.6.2) večkrat vbrizgamo in izmerimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo višine ali površine vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.3.2), pri čemer uporabimo enake volumne kakor za raztopino za umerjanje, in določimo srednjo vrednost višin (površin) vrhov halofuginona.

6. **Izračun rezultatov**

Koncentracijo raztopine v µg/ml določimo iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov halofuginona raztopine vzorca iz umeritvene krivulje (5.4.2).

Vsebnost halofuginona w (mg/kg) vzorca je dana z enačbo:

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

pri čemer je:

— c: koncentracija halofuginona v raztopini vzorca v µg/ml,

— m: masa preskušanega vzorca, v gramih.

7. **Validacija rezultatov**

7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, s katero primerjamo spekter ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.6.2), ki vsebuje 6,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umerjanje (3.6.2). Množina dodanega halofuginona mora biti podobna ocenjeni množini halofuginona v ekstraktu vzorca.

Povišan je lahko le vrh halofuginona, potem ko smo upoštevali dodano množino, pa tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici maksimalne višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo po naslednjih merilih:

(a) valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standardov, zabeležena na najvišji točki kromatograma, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diodo je to normalno znotraj ± 2 nm;

(b) med 225 in 300 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki kromatografskega vrha, v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi isti in kadar na nobeni opazovani točki odmik med spektroma ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) med 225 in 300 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki ju dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi isti in kadar na nobeni od opazovanih točk odmik med spektri ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eno teh meril ni doseženo, prisotnost analita ni bila potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme biti večja od 0,5 mg/kg za vsebnost halofuginona do 3 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 80 %.

8. **Rezultati medlaboratrijske primerjalne študije**

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija ([1]) treh vzorcev, ki so bili analizirani v osmih laboratorijih.

Rezultati

	Vzorec A (slepi) ob sprejemu	Vzorec B (moka)		Vzorec C (peleti)	
		ob sprejemu	po dveh mesecih	ob sprejemu	po dveh mesecih
Srednja vrednost ([1])	n. o.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	–	16	18	14	17
izk.		86	74	88	75

([1]): enote v mg/kg
n. o.: ni zaznano
S_R: standardni odmik obnovljivosti
CV_R: koeficient variacije (%)
izk.: izkoristek (%.)

([1]) The Analyst 108, 1983, strani od 1252 do 1256.