31993L0070

A UNSPREZECEA DIRECTIVĂ 93/70/CEE A COMISIEI
din 28 iulie 1993
de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Economice Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([1]), astfel cum a fost modificată ultima dată de Regulamentul (CEE) nr. 3768/85 ([2]), în special articolul 2,

întrucât Directiva 70/373/CEE impune controlul oficial al furajelor pentru a se verifica dacă acestea sunt în conformitate cu cerințele referitoare la calitate și compoziție, stabilite de actele cu putere de lege și de actele administrative, ce se aplică prin modalitățile de prelevare de probe și metodele comunitare de analiză;

întrucât trebuie stabilită o metodă comunitară de analiză pentru adaosul de halofuginonă care să fie folosită atunci când se verifică respectarea condițiilor de utilizare a acesteia în furaje;

întrucât măsurile prevăzute de prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre impun ca analizele pentru determinarea conținutului de halofuginonă la controlul oficial al furajelor să se efectueze prin metoda descrisă în anexa la prezenta directivă.

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 30 iunie 1994. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele conțin o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o astfel de trimitere la data publicării oficiale. Modalitățile de efectuare a acestei trimiteri se stabilesc de statele membre.

Articolul 3

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 28 iulie 1993.

Pentru Comisie

René STEICHEN

Membru al Comisiei

([1]) JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
([2]) JO L 362, 31.12.1985, p. 8.

ANEXĂ

DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HALOFUGINONĂ

DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-onă-hidrobromidă

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă determină prezența halofuginonei în furaje. Limita inferioară de determinare este de 1 mg/kg.

2. **Principiu**

După tratarea cu apă fierbinte, halofuginona se extrage ca bază liberă în acetat de etil și, ulterior, se separă ca hidroclorid într-o soluție apoasă de acid. Extractul se purifică prin cromatografie cu transfer de ioni. Conținutul de halofuginonă se determină prin cromatografie cu lichid de înaltă performanță (HPLC) cu fază rezervată, prin utilizarea unui detector de raze UV.

3. **Reactivi**

3.1. Acetonitril din categoria HPLC

3.2. Rășină de amberlită XAD-2

3.3. Acetat de amoniu

3.4. Acetat de etil

3.5. Acid acetic, glacial

3.6. Substanța standard halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-cloro-3-[3-hidroxi-2-piperidil)acetonil] chinazolină-4-(3H)-onă-hidrobromidă, E 764)

3.6.1. Soluție standard halofuginonă de stoc, 100 µg/ml

Se cântăresc, cu toleranță de 0,1 mg, 50 mg de halofuginonă (3.6) într-un balon gradat de 500 ml, apoi se dizolvă în soluție tampon de acetat de amoniu (3.18), se completează până la gradație cu soluție tampon și se amestecă. Această soluție este stabilă timp de trei săptămâni, la 5 °C, dacă este depozitată la întuneric.

3.6.2. Soluții de calibrare

În câteva baloane gradate de 100 ml, se transferă 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 și 6,0 ml de soluție standard de stoc (3.6.1). Se completează până la gradație prin adăugarea de fază mobilă (3.21) și se amestecă. Soluțiile au concentrații de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 și 6,0 µg/ml în halofuginonă. Aceste soluții se prepară imediat, înainte de a fi utilizate.

3.7. Acid clorhidric (ρ_{20} aproximativ 1,16 g/ml)

3.8. Metanol

3.9. Nitrat de argint

3.10. Ascorbat de sodiu

3.11. Carbonat de sodiu

3.12. Clorură de sodiu

3.13. EDTA (acid etilendiaminotetraacetic, sare disodică)

3.14. Apă, de categorie HPLC

3.15. Soluție de carbonat de sodiu, β = 10 g/100 ml

3.16. Clorură de sodiu - soluție saturată de carbonat de sodiu, β = 5 g/100 ml

Se dizolvă 50 g de carbonat de sodiu (3.11) în apă, se diluează până la 1 l și se adaugă clorură de sodiu (3.12) până la saturarea soluției.

3.17. Acid clorhidric, aproximativ 0,1 mol/l

Se diluează 10 ml de HCl (3.7) în apă până la 1 litru.

3.18. Soluție tampon de acetat de amoniu, aproximativ 0,25

Se dizolvă 19,3 g de acetat de amoniu (3.3) și 30 ml de acid acetic (3.5) în apă (3.14) și se diluează până la 1 l.

3.19. Prepararea rășinii de amberlită XAD-2

Se spală cu apă o cantitate corespunzătoare de amberlită (3.2) până la îndepărtarea tuturor ionilor de clor, după cum indică testul cu nitrat de argint (3.20) efectuat în faza apoasă eliminată. Apoi se spală rășina cu 50 ml de metanol (3.8), se elimină metanolul și se depozitează rășina în metanol proaspăt.

3.20. Soluție de nitrat de argint, aproximativ 0,1 mol/l

Se dizolvă 0,17 g de nitrat de argint (3.9) în 10 ml de apă.

3.21. Faza mobilă HPLC

Se amestecă 500 ml de acetonitril (3.1) cu 300 ml soluție tampon de acetat de amoniu (3.18) și 1 200 ml de apă (3.14). Se reglează pH-ul la valoarea 4,3 folosind acid acetic (3.5). Se filtrează printr-un filtru de 0,22 µm (4.8) și se degazează soluția (de exemplu prin expunere la ultrasunete timp de 10 minute). Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este depozitată într-un recipient închis, la întuneric.

4. **Aparatură**

4.1. Baie cu ultrasunete

4.2. Vaporizator de film rotativ

4.3. Centrifugă

4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu sistem de diode

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 300 mm × 4 mm, C 18, ambalaj de 10 µm sau o coloană echivalentă

4.5. Coloană de sticlă (300 mm × 10 mm) prevăzută cu filtru de sticlă sinterizată și cu robinet de închidere

4.6. Filtre din fibră de sticlă, cu diametru de 150 mm

4.7. Filtre cu membrană, 0,45 µm

4.8. Filtre cu membrană, 0,22 µm

5. **Procedură**

Notă: Halofuginona sub formă de bază liberă este instabilă în soluții alcaline sau de acetat de etil. Substanța nu trebuie să rămână în acetat de etil mai mult de 30 de minute.

5.1. Generalități

5.1.1. Se analizează o rație-martor pentru a verifica absența halofuginonei și a substanțelor de interferență.

5.1.2. Trebuie să se efectueze un test de recuperare prin analiza rației martor care a fost întărită prin adăugarea unei cantități de halofuginonă, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru întărirea până la un nivel de 3 mg/kg se adaugă 300 µl din soluția standard de stoc (3.6.1) până la 10 g de rație martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (5.2).

Notă: conform acestei metode, proba martor trebuie să fie similară, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu trebuie să se detecteze halofuginonă.

5.2. Extracția

Se cântăresc, cu toleranță de 0,1 g, 10 g de eșantion preparat, într-un tub de centrifugă de 200 ml, se adaugă 0,5 g de ascorbat de sodiu (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) și 20 ml de apă, apoi se amestecă. Se așează tubul timp 5 minute într-o baie de apă (80 °C). După răcirea la temperatura camerei se adaugă 20 ml soluție de carbonat de sodiu (3.15) și se amestecă. Se adaugă imediat 100 ml acetat de etil (3.4) și se agită energic cu mâna timp de 15 secunde. Apoi tubul se așează într-o baie cu ultrasunete (4.1) timp de 3 minute și se desface dopul. Se centrifughează timp de 2 minute și se decantează faza de acetat de etil printr-un filtru de fibră de sticlă (4.6), într-o pâlnie de separare de 500 ml. Se repetă extracția eșantionului cu o a doua cantitate de 100 ml acetat de etil. Se spală extractele combinate timp de 1 minut cu 50 ml de soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu (3.16) și se îndepărtează stratul apos.

Se extrage stratul organic timp de 1 minut cu 50 ml de acid clorhidric (3.17). Se trece stratul de acid cel mai de jos printr-o pâlnie de separare de 250 ml. Se extrage din nou stratul organic timp de 1,5 minute, cu o altă cantitate de 50 ml acid clorhidric, apoi se combină cu primul extract. Se spală extractele de acid combinate prin agitare rapidă timp de aproximativ 10 secunde cu 10 ml de acetat de etil (3.4).

Se transferă cantitatea de strat apos într-un pahar de 250 ml cu fundul rotund și se îndepărtează faza organică. Se evaporă tot acetatul de etil din soluția acidă utilizând un vaporizator de film rotativ (2.4). Temperatura băii de apă nu trebuie să depășească 40 °C. În condițiile unui vid la aproximativ 25 mbar se îndepărtează întreaga cantitate de acetat de etil rezidual în 5 minute la 38 °C.

5.3. Curățarea

5.3.1. Pregătirea coloanei de amberlită

Pentru fiecare extract probă se pregătește câte o coloană XAD-2. Se transferă 10 g de amberlită preparată (3.19) într-o coloană de sticlă (4.5) cu metanol (3.8). Se adaugă un mic dop de vată de sticlă deasupra patului de rășină. Se scurge metanolul din coloană și se spală rășina cu 100 ml de apă, oprind fluxul pe măsură ce lichidul ajunge la partea superioară a patului de rășină. Se lasă coloana să se echilibreze timp de 10 minute înainte de utilizare. Niciodată nu se lasă coloana să se usuce.

5.3.2. Curățarea probei

Se transferă extractul (5.2) în partea superioară a coloanei cu amberlită (5.3.1) și se eluează, apoi se îndepărtează diluatul. Rata de eluție nu trebuie să depășească 20 ml/min. Se clătește paharul cu fund rotund cu 20 ml de acid clorhidric (3.17), apoi acesta se folosește pentru spălarea coloanei de rășină. Se usucă orice urmă de soluție acidă rămasă cu ajutorul unui curent de aer. Se îndepărtează substanțele spălate. Se adaugă 100 ml de metanol (3.8) în coloană și se eluează 5-10 ml; se colectează eluatul într-un pahar de 250 ml cu fundul rotund. Se lasă metanolul rămas timp de 10 minute să se echilibreze cu rășina și se continuă eluția la o rată care să nu depășească 20 ml/min, colectând eluatul în același pahar cu fundul rotund. Se evaporă metanolul cu evaporator de film rotativ (4.2), iar temperatura băii de apă nu trebuie să depășească 40 °C. Se transferă cantitatea de reziduu într-un pahar calibrat de 10 ml, utilizând faza mobilă (3.21). Se aduce la gradație cu ajutorul fazei mobile și se amestecă. Se filtrează o cotă-parte printr-un filtru cu membrană (4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea HPLC (5.4).

5.4. Determinarea HPLC

5.4.1. Parametrii

Condițiile următoare sunt oferite drept ghid, pot fi folosite și alte condiții dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană de cromatografie lichidă (4.4.1)

Fază mobilă HPLC (3.21)

Rata fluxului: 1,5 la 2 ml/min

Lungimea de undă de detectare: 243 nm

Volumul de injecție: 40-100 µl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic prin injectarea soluției de calibrare (3.6.2) care conține 3,0 µg/ml, de mai multe ori, până la atingerea unui punct (sau a unui platou) maxim constant și a timpilor de retenție.

5.4.2. Graficul de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.6.2) de câteva ori și se măsoară punctele (platourile) maxime pentru fiecare concentrație. Se trasează graficul de calibrare folosind principalele puncte (sau platouri) maxime ale soluției de calibrare, pe ordonată și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, pe abscisă.

5.4.3. Soluția probă

Se injectează de câteva ori extractul probă (5.3.2) utilizând același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină valoarea medie a punctului (platoului) maxim în funcție de punctele de maxim pentru halofuginonă.

6. **Calcularea rezultatelor**

Se determină concentrația soluției eșantion în µg/ml din valoarea medie a punctului (platoului) maxim, calculat în funcție de punctele de maxim pentru halofuginonă a soluției eșantion, cu ajutorul trimiterii la graficul de calibrare (5.4.2).

Conținutul de halofuginonă w (mg/kg) al eșantionului este dat de formula următoare:

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

unde:

— c = concentrația de halofuginonă din soluția eșantion, în µg/ml

— m = masa porției de testat, în grame

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. Identitatea

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu sistem de diode cu care se compară spectrul extractului de probă și cel al soluției de calibrare (3.6.2), care conține 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un extract de probă este întărit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (3.6.2). Cantitatea de halofuginonă adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de halofuginonă găsită în extractul de probă.

După ce se iau în considerație atât cantitatea adăugată, cât și diluția extractului, trebuie mărit numai punctul maxim pentru halofuginonă. Lățimea punctului maxim, la jumătate din înălțimea sa maximă, trebuie să fie de ± 10 % din lățimea originală.

7.1.2. Detectorul cu sistem de diode

Evaluarea rezultatelor se face conform următoarelor criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a probei și a spectrului standard, înregistrată la apexul punctului de maxim pe cromatogramă, trebuie să fie aceeași în limita unei marje determinate de puterea de rotire a sistemului de detectare. Pentru detectarea cu sistem de diode, aceasta este, de obicei, de ± 2 nm;

(b) între 225 și 300 nm, eșantionul și spectrul standard înregistrate la apexul punctului de maxim pe cromatogramă nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului aflate în intervalul de 10 până la 100 % de absorbție relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași puncte maxime și când, în nici un punct observat, deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția analitului standard;

(c) între 225 și 300 nm, spectrele pentru partea superioară a curbei, apex și partea inferioară a curbei punctului de maxim produse de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului aflate în intervalul de 10 până la 100 % de absorbție relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași puncte de maxim și când în nici un punct observat deviația dintre cele două spectre nu depășește 15 % din absorbția spectrului apexului.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. Repetabilitatea

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,5 mg/kg, pentru un conținut de halofuginonă de maxim 3 mg/kg.

7.3. Recuperarea

Pentru proba martor întărit, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 80 %.

8. **Rezultatele unui studiu de colaborare**

A fost realizat un studiu de colaborare ([1]) în care au fost analizate trei probe de către opt laboratoare.

Rezultate

	Proba A (martor) la primire	Proba B (făină)		Proba C (pelete)	
		la primire	după două luni	la primire	după două luni
Valoarea medie ([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
rec.		86	74	88	75

([1]): unități în mg/kg
n.d.: nedetectat
S_R: deviația standard a reproductibilității
CV_R: coeficient de variație (%)
rec.: recuperare (%)

([1]) *The Analyst* 108, 1983, p. 1252-1256.