31993L0070

17.9.1993 *ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ* L 234/17

JEDENÁCTÁ SMĚRNICE KOMISE 93/70/EHS

ze dne 28. července 1993,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv ([1]), naposledy pozměněnou nařízením (EHS) č. 3768/85 ([2]), a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že směrnice 70/373/EHS vyžaduje, aby se úřední kontroly krmiv pro účely kontroly, zda krmiva splňují požadavky vyplývající z ustanovení právních a správních předpisů týkajících se jejich jakosti a složení, prováděly za použití metod odběru vzorků a analýzy platných ve Společenství;

vzhledem k tomu, že by měla být v rámci Společenství stanovena metoda analýzy pro přidaný halofuginon k použití při kontrole, zda vyhovuje podmínkám pro jeho použití ve výživě zvířat;

vzhledem k tomu, že opatření podle této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy vyžadují, aby se analýzy obsahu halofuginonu pro účely úřední kontroly krmiv prováděly za použití metody popsané v příloze této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 30. června 1994. Uvědomí o nich neprodleně Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 28. července 1993.

Za Komisi

René STEICHEN

člen Komise

([1]) Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Úř. věst. L 362, 31.12.1985, s. 8.

PŘÍLOHA

STANOVENÍ OBSAHU HALOFUGINONU

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid

1. **Účel a rozsah**

Touto metodou se stanovuje obsah halofuginon v krmivech. Dolní mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

2. **Princip**

Po zahřátí v horké vodní lázni se halofuginon extrahuje jako volná báze do ethylacetátu a následně se oddělí jako hydrochlorid do kyselé vodní fáze. Extrakt se přečistí ionexovou chromatografií. Obsah halofuginonu se stanoví vysokoúčinnou kapalnou chromatografií na reverzní fázi (HPLC), za použití UV detektoru.

3. **Činidla**

3.1 Acetonitril, pro HPLC

3.2 Amberlit XAD-2 pryskyřice

3.3 Acetát amonný

3.4 Ethylacetát

3.5 Kyselina octová, ledová

3.6 Halofuginon, standardní látka (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid, E 764)

3.6.1 Halofuginon, standardní zásobní roztok, 100 µg/ml

Do odměrné baňky o obsahu 500 ml se naváží 50 mg halofuginonu (3.6) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v tlumivém roztoku acetátu amonného (3.18), doplní po značku tlumivým roztokem a promíchá. Tento roztok je stálý tři týdny při teplotě 5 °C, je-li skladován ve tmě.

3.6.2 Kalibrační roztoky

Do řady odměrných baněk o obsahu po 100 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 ml standardního roztoku (3.6.1). Doplní se po značku mobilní fází (3.21) a promíchá. Roztoky mají koncentrace halofuginonu 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 µg/ml. Tyto roztoky se musí připravovat vždy čerstvě před použitím.

3.7 Kyselina chlorovodíková (p_{20} přibližně 1,16 g/ml)

3.8 Methanol

3.9 Dusičnan stříbrný

3.10 Askorbát sodný

3.11 Uhličitan sodný

3.12 Chlorid sodný

3.13 EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové)

3.14 Voda, pro HPLC

3.15 Uhličitan sodný, roztok δ = 10 mg/100 ml

3.16 Uhličitan sodný, roztok – saturovaný chloridem sodným, δ = 5 g/100 ml

50 g uhličitanu sodného (3.11) se rozpustí ve vodě, doplní se na 1 l a přidává se chlorid sodný (3.12), až k nasycení roztoku.

3.17 Kyselina chlorovodíková, přibližně 0,1 mol/l

10 ml HCl (3.7) se zředí vodou na 1 l.

3.18 Tlumivý roztok acetátu amonného, přibližně 0,25 mol/l

19,3 g acetátu amonného (3.3) a 30 ml octové kyseliny (3.5) se rozpustí ve vodě (3.14) a zředí se na 1 l.

3.19 Ionexová pryskyřice Amberlit XAD-2 - příprava

Přiměřené množství amberlitu (3.2) se promývá ve vodě, až se odstraní všechny chloridové ionty, což se prokáže testem pomocí dusičnanu stříbrného na odstraňované vodní fázi. Pak se pryskyřice promyje 50 ml methanolu (3.8), který se odstraní a pryskyřice se uloží pod čerstvý methanol.

3.20 Dusičnan stříbrný, roztok přibližně 0,1 mol/l

0,17 g dusičnanu stříbrného (3.9) se rozpustí v 10 ml vody.

3.21 Mobilní fáze HPLC

Smíchá se 500 ml acetonitrilu (3.1), 300 ml tlumivého roztoku acetátu amonného (3.18) a s 1 200 ml vody (3.14). pH se upraví na 4,3 za použití kyseliny octové (3.5). Přefiltruje se filtrem 0,22 μm (4.8) a roztok se odplyní (tj. vystaví se ultrazvuku po dobu 10 minut). Tento roztok je stálý po dobu 1 měsíce, je-li skladován v temnotě a v uzavřené nádobě.

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 Ultrazvuková lázeň

4.2 Rotační odpařovač

4.3 Odstředivka

4.4 Zařízení HPLC s ultrafialovým detektorem o různých vlnových délkách nebo s detektorem diodového pole

4.4.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 300 mm x 4 mm, C 18, 10 μm, nebo jiná rovnocenná kolona

4.5 Skleněné kolony (300 mm x 10 mm) opatřené filtrem z křemičitého skla a uzavíracím kohoutem

4.6 Filtry ze skleněných vláken, průměr filtru 150 mm

4.7 Membránové filtry, 0,45 μm

4.8 Membránové filtry, 0,22 μm

5. **Postup**

Poznámka Halofuginon jako volná báze je nestálý v alkalických roztocích a v roztocích ethylacetátu. Neměl by zůstat v roztoku ethylacetátu déle než 30 minut.

5.1 Všeobecně

5.1.1 Modelové krmivo se musí předem analyzovat pro kontrolu, zda neobsahuje halofuginon nebo jiné interferující látky.

5.1.2 Provádí se test výtěžnosti analýzou modelového krmiva, které bylo obohaceno přidáním takového množství halofuginonu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na úroveň 3 mg/kg se přidá 300 μl standardního zásobního roztoku (3.6.1) k 10 g modelového krmiva, promíchá se a vyčká 10 minut, než se bude pokračovat v extrakčním postupu (5.2).

Poznámka Pro účely této metody by mělo být modelové krmivo podobného druhu jako vzorek a při jeho analýze by neměl být stanoven halofuginon.

5.2 Extrakce

Do odstřediskové zkumavky o obsahu 200 ml se naváží 10 g upraveného vzorku s přesností na 0,1 g, přidá se 0,5 g askorbátu sodného (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) a 20 ml vody a zamíchá se. Zkumavka se umístí na 5 minut do vodní lázně (80 °C). Po vychladnutí na teplotu místnosti se přidá 20 ml roztoku uhličitanu sodného (3.15) a zamíchá se. Ihned se přidá 100 ml ethylacetátu (3.4) a ručně se silně 15 sekund třepe. Pak se zkumavka s uvolněnou zátkou umístí na tři minuty do ultrazvukové lázně (4.1). Odstřeďuje se dvě minuty a ethylacetátová fáze se odlije přes filtr ze skleněných vláken (4.6) do separační nálevky o obsahu 500 ml. Extrakce vzorku se opakuje s dalšími 100 ml ethylacetátu. Kombinované extrakty se promývají jednu minutu 50 ml roztoku uhličitanu sodného saturovaného chloridem sodným (3.16) a poté se vodná vrstva odstraní.

Organická vrstva se extrahuje po dobu jedné minuty 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.17). Spodní kyselinová vrstva se vypustí do separační nálevky o obsahu 250 ml. Organická vrstva se znovu extrahuje 1,5 minuty s dalšími 50 ml kyseliny chlorovodíkové a kyselinová vrstva se spojí s prvním extraktem. Spojené kyselinové extrakty se třepou přibližně 10 sekund s 10 ml ethylacetátu (3.4).

Vodná vrstva se kvantitativně převede do 250 ml baňky s kulatým dnem a organická fáze se odstraní. Pomocí rotačního odpařovače (4.2) se z kyselého roztoku odpaří všechen zbývající ethylacetát. Teplota vodní lázně nesmí přesáhnout 40 °C. Ve vakuu přibližně 25 mbar se všechen zbývající ethylacetát odstraní během 5 minut při teplotě 38 °C.

5.3 Přečištění

5.3.1 Příprava amberlitové kolony

Pro každý extrakt vzorku se připraví kolona s XAD-2. Do skleněné kolony (4.5) se přenese 10 g připraveného amberlitu (3.19) spolu s methanolem (3.8). Na horní konec pryskyřicového sloupce se vloží malá zátka ze skelné vaty. Methanol ze sloupce se odstraní a sloupec se promyje 100 ml vody. Přívod vody se zastaví, jakmile tekutina dosáhne horní konec pryskyřicového sloupce. Před použitím se sloupec nechá 10 minut ekvilibrovat. Sloupec nesmí nikdy vyschnout.

5.3.2 Čištění vzorku

Extrakt (5.2) se kvantitativně převede na horní část připraveného amberlitového sloupce (5.3.1) a eluje se, přičemž eluát se odstraňuje. Rychlost eluce nemá přesáhnout 20 ml/min. Baňka s kulatým dnem se vypláchne 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.17) a tuto tekutina se použije k promytí ionexového sloupce. Zbytek kyselého roztoku se z kolony odstraní proudem vzduchu. Promývací roztok se také odstraní. Na sloupec se přidá 100 ml methanolu (3.8) a vypustí se asi 5 až 10 ml eluátu do baňky s kulatým dnem o obsahu 250 ml. Zbývající methanol se nechá 10 minut ustát na sloupci a potom se pokračuje v promývání rychlostí, která nepřesáhne 20 ml/min. Eluát se shromažďuje v téže bańce s kulatým dnem. Methanol se odpaří na rotačním odpařovači (4.2), teplota vodní lázně nemá přesáhnout 40 ° C. Zbytek se pomocí mobilní fáze (3.21) kvalitativně převede do odměrné baňky o obsahu 10 ml. Doplní se mobilní fází po značku a promíchá se. Poměrná část se filtruje membránovým filtrem (4.7). Tento roztok se uschová pro stanovení HPLC (5.4).

5.4 Stanovení HPLC

5.4.1 Parametry

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky pokud zajišťují obdobné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.4.1.)

HPLC mobilní fáze (3.21)

Rychlost průtoku: 1,5 až 2 ml/min

Detekční vlnová délka: 243 nm

Objem nástřiku: 40 až 100 µl

Stálost chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (3.6.2), který obsahuje 3,0 µg/ml halofuginonu. Opakuje se několikrát, až se dosáhne konstantní výšky (plochy) píků a konstantních retenčních časů.

5.4.2 Kalibrační křivka

Provede se několikrát nástřik kalibračního roztoku (3.6.2) a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se narýsuje s použitím středních hodnot výšek nebo ploch píků kalibračních roztoků jako ordináty a příslušných koncentrací v µg/ml jako souřadnic.

5.4.3 Roztoky vzorků

Provede se několikrát nástřik roztok vzorku (5.3.2), přičemž se použije stejný objem jako pro kalibrační roztoky a zjistí se střední výška (plocha) halofuginonových píků.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

Koncentrace roztoku vzorku v µg/ml se zjistí ze střední výšky (plochy) halofuginonových píků v roztoku vzorku porovnáním s kalibrační křivkou (5.4.2).

Obsah halofuginonu w (mg/kg) ve vzorku je dán touto rovnicí:

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

kde:

c: koncentrace halofuginonu v roztoku vzorku v µg/ml,

m: hmotnost navážky vzorku v gramech.

7. **Ověření výsledků**

7.1 Identita

Identita analytu vzorku může být potvrzena opakovaným stanovením s přídavkem (co-chromatography) nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (3.6.2) obsahujícího 6,0 µg/ml halofuginonu.

7.1.1 Opakované stanovení s přídavkem (co-chromatography)

Extrakt vzorku se fortifikuje přidáním příslušného množství kalibračního roztoku (3.6.2). Množství přidaného halofuginonu by mělo odpovídat obsahu halofuginonu v extraktu vzorku.

Mělo by dojít pouze ke zvýšení píku halofuginonu, vzhledem k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině jeho maximální výšky musí být v rozmezí ± 10 % původní šířky.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky jsou posuzovány podle následujících kritérií:

a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s nepřesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává ± 2 nm;

b) při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí záznam spektra zkoušeného vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku chromatogramu lišit od částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže odchylka mezi dvěma spektry nikde nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu;

c) při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí spektrum vzestupu, vrcholu a sestupu píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních v této části spektra v rozsahu od 10 do 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže není dosaženo některého z těchto kritérií, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení prováděných na stejném vzorku nesmí překročit 0,5 mg/kg při obsahu halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3 Výtěžnost (recovery)

Výtěžnost pro fortifikovaný vzorek musí být nejméně v 80 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

Při kruhovém testu ([1]) byly osmi laboratořemi analyzovány tři vzorky.

Výsledky

	Vzorek A (modelový) při převzetí	Vzorek B (mouka)		Vzorek C (pelety)	
		při převzetí	po dvou měsících	při převzetí	po dvou měsících
Střední ([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]): jednotky v mg/kg.
n.d.: nezjištěno.
S_R: standardní odchylka reprodukovatelnosti.
CV_R: variační koeficient reprodukovatelnosti (%).
rec: výtěžnost (%).

([1]) *The Analyst* 108, 1983, s. 1252 až 1256.