

31993L0070

17.9.1993

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 234/17

JEDENASTA DYREKTYWA KOMISJI 93/70/EWG**z dnia 28 lipca 1993 r.****ustanawiająca wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz ⁽¹⁾, ostatnio zmienioną rozporządzeniem (EWG) nr 3768/85 ⁽²⁾, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa 70/373/EWG wymaga, aby urzędowe kontrole pasz były przeprowadzane przy użyciu wspólnotowych metody pobierania próbek i analizy w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych lub administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

należy ustalić wspólnotową metodę analizy dotyczącą dodatku halofuginonu w celu jej wykorzystywania przy sprawdzaniu zgodności z warunkami jego stosowania w żywieniu zwierząt;

środki przyjęte w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, aby do analizy zawartości halofuginonu, do celów urzędowej kontroli pasz, stosowana była metoda opisana w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 30 czerwca 1994 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 28 lipca 1993 r.

W imieniu Komisji

René STEICHEN

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

⁽²⁾ Dz.U. L 362 z 31.12.1985, str. 8.

ZAŁĄCZNIK

OZNACZANIE HALOFUGINONU

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-3-hydroksy-2-piperydył]acetonył]-chinazolina-4-(3H)-jednohydrobromian.

1. Cel i zakres

Metoda ta służy oznaczaniu zawartości halofuginonu w paszach. Dolna granica oznaczenia wynosi 1 mg/kg.

2. Zasada

Poddany działaniu gorącej wody halofuginon jest ekstrahowany jako wolna zasada w octanie etylowym, a następnie rozdzielona jako związek chlorowodorowy w wodnym roztworze kwasu. Ekstrakt jest oczyszczany metodą chromatografii jonowymiennej. Zawartość halofuginonu jest oznaczana za pomocą chromatografii cieczowej wysokiej wydajności z odwróconymi fazami (HPLC) z wykorzystaniem detektora UV.

3. Odczynniki

3.1. Acetonitryl, klasa HPLC

3.2. Żywica amberlitowa XAD-2

3.3. Octan amonowy

3.4. Octan etylowy

3.5. Lodowy kwas octowy

3.6. Wzorcowy halofuginon (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-3-hydroksy-2-piperydył]acetonył]-chinazolina-4-(3H)-jednohydrobromian, E 764)

3.6.1. Wzorcowy roztwór halofuginonu o stężeniu 100 µg/ml

Odważyć 50 mg halofuginonu (ppkt 3.6) z dokładnością do 0,1 mg w kolbie z podziałką o pojemności 500 ml, rozpuścić w buforowym roztworze octanu amonowego (ppkt 3.18), uzupełnić do oznaczenia roztworem buforowym i zamieszać. Roztwór ten przechowywany bez dopływu światła zachowuje stabilność przez trzy tygodnie w temperaturze 5 °C.

3.6.2. Roztwory wzorcowe

Do kilku kolb z podziałką o pojemności 100 ml przenieść 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 6,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (ppkt 3.6.1). Uzupełnić do oznaczenia fazą ruchomą (ppkt 3.21) i wymieszać. Roztwory te mają odpowiednio stężenia 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 6,0 µg/ml halofuginonu. Roztwory te należy przygotowywać tuż przed użyciem.

3.7. Kwas chlorowodorowy (ρ_{20} około 1,16 g/ml).

3.8. Metanol

3.9. Azotan srebra

3.10. Askorbinian sodu

3.11. Węglan sodu

3.12. Chlorek sodu

3.13. EDTA (kwas etylenodwuaminocteroowy, sól disodowa)

3.14. Woda, klasa HPLC

3.15. Roztwór węglanu sodowego, $\beta = 10$ g/100 ml

3.16. Roztwór węglanu sodowego nasycony chlorkiem sodowym, $\beta = 5$ g/100 ml

Rozpuścić 50 g węglanu sodowego (ppkt 3.11) w wodzie, rozcieńczyć w stosunku 1:1 i dodawać chlorek sodu (ppkt 3.12) aż do nasycenia roztworu.

3.17. Kwas chlorowodorowy o stężeniu 0,1 mol/l

Sporządzić roztwór 10 ml HCl (ppkt 3.7) w wodzie w stosunku 1: 1.

3.18. Roztwór buforowy octanu amonowego, w przybliżeniu 0,25.

Rozpuścić 19,3 g octanu amonowego (ppkt 3.3) i 30 ml kwasu octowego (ppkt 3.5) w wodzie (ppkt 3.14) i rozcieńczyć w stosunku 1:1.

3.19. Przygotowanie żywicy amberlitowej XAD-2

Plukać odpowiednią ilość amberlitu (ppkt 3.2) w wodzie, dopóki nie zostaną usunięte wszystkie jony chlorkowe, zgodnie ze wskazaniami badania azotanem srebra (ppkt 3.20) przeprowadzanego na odrzuconej fazie ciekłej. Następnie wypłukać żywicę w 50 ml metanolu (ppkt 3.8), wyłączyć metanol i przechowywać żywicę w świeżym metanolu.

3.20. Roztwór azotanu srebra o stężeniu około 1 mol/l

Rozpuścić 0,17 g azotanu srebra (ppkt 3.9) w 10 ml wody.

3.21. Faza ruchoma chromatografii cieczowej HPLC

Wymieszać 500 ml acetonitrylu (ppkt 3.1) z 300 ml buforowego roztworu octanu amonowego (ppkt 3.18) i 1 200 ml wody (ppkt 3.14). Skorygować pH do poziomu 4,3, stosując w tym celu kwas octowy (ppkt 3.5). Przefiltrować przez filtr 0,22 µm (ppkt 4.8) i odgazować roztwór (np. stosując ultradźwięki przez 10 min). Roztwór ten przechowywany bez dopływu światła w zamkniętym naczyniu zachowuje stabilność przez jeden miesiąc.

4. Aparatura

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa

4.2. Obrotowy aparat wyparny

4.3. Wirówka

4.4. Sprzęt do chromatografii cieczowej HPLC z detektorem promieniowania UV o różnych długościach fal lub detektor z zespołem diod.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 300 mm × 4 mm, C 18, napełnienie 10 mm lub inna równoważna kolumna

4.5. Szklana kolumna (300 mm × 10 mm) wyposażona w filtr ze szkła matowego i zawór.

4.6. Filtry z włókien szklanych, średnica 150 mm

4.7. Filtry membranowe, 0,45 µm

4.8. Filtry membranowe, 0,22 µm

5. Procedura

Uwaga: Halofuginon w postaci wolnej zasady jest niestabilny w roztworach zasadowym i octanu etylowego. Nie powinien on pozostawać w octanie etylowym dłużej niż przez 30 min.

5.1. Przepisy ogólne

5.1.1. Należy przeprowadzić analizę metodą ślepej próby w celu sprawdzenia obecności halofuginonu lub substancji zakłócających.

5.1.2. Test odzysku powinien być przeprowadzony poprzez analizę metodą ślepej próby, która została wzmocniona przez dodanie pewnej ilości halofuginonu, podobnego do występującego w próbce. W celu zwiększenia stężenia do poziomu 3 mg/kg dodać 300 ml wzorcowego roztworu podstawowego (ppkt 3.6.1) do 10 g ślepej próby, wymieszać i odczekać przez 10 min przed rozpoczęciem etapu ekstrakcji (ppkt 5.2).

Uwaga: do celów niniejszej metody ślepa próba powinna być podobna pod względem rodzaju do tej z badanej próbki i w czasie analizy nie powinno dojść do wykrycia halofuginonu.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć 10 g przygotowanej próbki z dokładnością do 0,1 g do probówki wirówki o pojemności 200 ml, dodać 0,5 g askorbinianu sodu (ppkt 3.10), 0,5 g EDTA (ppkt 3.13) i 20 ml wody, a następnie wymieszać. Umieścić probówkę na 5 min w łaźni wodnej (80 °C). Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodać 20 ml roztworu węgla sodowego (ppkt 3.15) i wymieszać. Natychmiast dodać 100 ml octanu etylowego (ppkt 3.4) i mocno wstrząsać w rękę przez 15 sekund. Następnie umieścić probówkę na trzy minuty w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.1) i poluzować korek. Odwirowywać przez dwie minuty i zdekantować fazę octanu etylowego przez filtr z włókna szklanego (ppkt 4.6) do lejka rozdzielczego o pojemności 500 ml. Powtórzyć proces ekstrakcji próbki z drugą porcją 100 ml octanu etylowego. Plukać połączone ekstrakty przez jedną minutę, używając 50 ml roztworu węgla sodowego nasyconego chlorkiem sodowym (ppkt 3.16), i odrzucić warstwę wody.

Ekstrahować warstwę organiczną przez 1 min za pomocą 50 ml kwasu chlorowodorowego (ppkt 3.17). Odprowadzić dolną warstwę kwasu do lejka rozdzielczego o pojemności 250 ml. Ponownie ekstrahować warstwę organiczną przez 1,5 min następną porcją 50 ml kwasu chlorowodorowego i połączyć z pierwszym ekstraktem. Wypłukać połączone ekstrakty kwasowe, mieszając przez około 10 sekund z 10 ml octanu etylowego (ppkt 3.4).

Przenieść ilościowo warstwę wody do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml i odrzucić fazę organiczną. Odparować cały pozostały octan etylowy z roztworu kwasu za pomocą obrotowego aparatu wyparnego (ppkt 2.4). Temperatura łaźni wodnej nie powinna przekraczać 40 °C. W warunkach podciśnienia wynoszącego około 25 mbara i w temperaturze 38 °C cała pozostała część octanu etylowego zostanie usunięta w ciągu 5 min.

5.3. Czystczenie

5.3.1. Przygotowanie kolumny amberlitowej

Kolumna XAD-2 jest przygotowywana do ekstrakcji każdej próbki. Przenieść 10 g przygotowanego amberlitu (ppkt 3.19) do szklanej kolumny (ppkt 4.5) z metanolem (ppkt 3.8). Wprowadzić mały korek z wełny szklanej w górną część złoża żywicy. Usunąć metanol z kolumny i przepłukać żywicę za pomocą 100 ml wody, zatrzymując odpływ z chwilą, gdy ciecz znajdzie się na poziomie górnej części złoża żywicy. Przed użyciem pozostawić kolumnę na 10 min w celu ustabilizowania. Nie wolno dopuścić do wyschnięcia kolumny.

5.3.2. Czystczenie próbki

Przenieść ekstrakt (ppkt 5.2) ilościowo do górnej części przygotowanej kolumny amberlitowej (ppkt 5.3.1) i poddać elucji, odrzucając eluat. Prędkość elucji nie powinna przekraczać 20 ml/min. Wypłukać kolbę okrągłodenną za pomocą 20 ml kwasu chlorowodorowego (ppkt 3.17) i wykorzystać go do przepłukania kolumny. Usunąć wszystkie pozostałości roztworu kwasu za pomocą strumienia powietrza. Zlać popłuczyny. Dodać 100 ml metanolu (ppkt 3.8) do kolumny i umożliwić elucję 5–10 ml, zbierając eluat do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Pozostawić resztę metanolu na 10 minut, aby uzyskać równowagę między nim i żywicą, i kontynuować elucję z prędkością nieprzekraczającą 20 ml/min, zbierając eluat do tej samej kolby okrągłodennej. Odparować metanol w obrotowym aparacie wyparnym (ppkt 4.2), przy czym temperatura łaźni wodnej nie powinna przekraczać 40 °C. Przenieść pozostałość ilościowo do kolby kalibracyjnej o pojemności 10 ml, używając fazy ruchomej (ppkt 3.21). Uzupełnić do oznaczenia fazą ruchomą i wymieszać. Podwielokrotność jest filtrowana przez filtr membranowy (ppkt 4.7). Zachować ten roztwór do oznaczenia HPLC (ppkt 5.4).

5.4. Oznaczanie za pomocą HPLC

5.4.1. Parametry

W celach orientacyjnych proponuje się zachowanie następujących warunków; można też stosować inne warunki, o ile pozwalają one uzyskać równoważne wyniki.

Kolumna do chromatografii cieczowej (ppkt 4.4.1)

Faza ruchoma do HCLP (ppkt 3.21)

Szybkość przepływu: 1,5–2 ml/min.

Długość fali wykrywania: 243 nm

Objętość iniekcji: 40–100 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, wtryskując kilkakrotnie roztwór wzorcowy (ppkt 3.6.2) zawierający 3,0 µg/l, dopóki nie uzyska się stałych wartości szczytowych (lub obszarów) i długości czasu retencji.

5.4.2. Krzywa wzorcowa

Każdy roztwór wzorcowy wstrzyknąć kilkakrotnie (ppkt 3.6.2) i dokonać pomiarów wartości szczytowych (obszarów) dla każdego stężenia. Sporządzić wzorcowy wykres, stosując średnie wartości szczytowe lub obszary roztworów wzorcowych jako rzędne oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml jako wartości osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Ekstrakt próbki wstrzyknąć kilkakrotnie (ppkt 5.3.2), używając takiej samej objętości jak w przypadku roztworów wzorcowych, i ustalić średnią wartość szczytową (obszar) halofuginonu.

6. Obliczanie wyników

Ustalić stężenie roztworu próbki w µg/ml na podstawie średniej wartości szczytowej (obszaru) halofuginonu w roztworze próbnym przez porównanie z wykresem wzorcowym (ppkt 5.4.2).

Zawartość halofuginonu w (mg/kg) próbki oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c: stężenie halofuginonu w roztworze próbnym w µg/l,

m: masa badanej porcji w gramach.

7. Ocena poprawności wyników

7.1. Identyczność

Identyczność analitu może być potwierdzona za pomocą chromatografii równoległej lub zastosowanie detektora z układem diod, za pomocą którego porównywane są zakresy ekstraktu próbki i roztworu wzorcowego (ppkt 3.6.2) zawierającej 6,0 µg/ml.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Próbny ekstrakt jest wzmacniany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu wzorcowego (ppkt 3.6.2). Ilość dodanego halofuginonu powinna być podobna do ilości szacunkowej halofuginonu odkrytej w próbnym ekstrakcie.

Tylko wysokość szczytowej wartości halofuginonu powinna zostać podwyższona po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość wartości szczytowej, przy połowie maksymalnej wysokości, musi mieścić się w około 10 % szerokości pierwotnej.

7.1.2. Wykrywanie diodowe

Wyniki są oceniane w oparciu o następujące kryteria:

- długość fali maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych, odnotowana dla szczytowego punktu chromatogramu, musi być taka sama w ramach marginesu ustalonego poprzez zdolność rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej wynosi ona na ogół ± 2 nm;
- między 225 a 300 nm próbka i wzorcowe widma odnotowane dla szczytowego wierzchołka chromatogramu nie mogą różnić się dla tych części widma w zakresie 10–100 % lub względnej absorpcji. To kryterium zostaje spełnione, gdy występują te same wartości maksymalne i w żadnym badanym punkcie odchylenia między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji wzorcowego analitu;
- między 225 a 300 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą się różnić od siebie dla tych części widma w zakresie 10–100 % względnej absorpcji. Kryterium to zostaje spełnione, gdy występują takie same wartości maksymalne i we wszystkich badanych punktach odchyłka między dwoma widmami nie przekracza 15 % absorpcji widma wartości szczytowej;

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie zostanie spełnione, obecność analizowanej substancji nie została potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbce nie może przekroczyć 0,5 mg/kg przy zawartości halofuginonu powyżej 3 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku wzmocnionej ślepej próbki odzysk powinien wynosić co najmniej 80 %.

8. Wyniki badań porównawczych

Zorganizowano badania porównawcze ⁽¹⁾, podczas których przeanalizowano trzy próbki w ośmiu laboratoriach.

Wyniki

	Próbka A (Ślepa) przy odbiorze	Próbka B (Mączka)		Próbka C (Granulki)	
		przy odbiorze	po dwóch miesiącach	przy odbiorze	po dwóch miesiącach
Średnia ¹	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
SR	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CVR	-	16	18	14	17
rec.		86	74	88	75

¹: jednostki w mg/kg.

n.d.: nie wykryto.

SR: odchylenie standardowe powtarzalności.

CVR: współczynnik zmienności (%).

rec.: odzysk (%).

⁽¹⁾ The Analyst 108 z 1983 r., str. 1252–1256.