

31993L0070

17.9.1993

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 234/17

JEDENÁSTA SMERNICA KOMISIE 93/70/EHS**z 28. júla 1993,****ktorou sa určujú metódy analýzy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív**

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód spoločenstva na vzorkovanie a analýzu na účel úradnej kontroly krmív ⁽¹⁾, naposledy zmenenú a doplnenú nariadením (EHS) č. 3768/85 ⁽²⁾, a najmä na jej článok 2,

keďže smernica 70/373/EHS požaduje úradné kontroly krmív s cieľom kontroly splnenia požiadaviek, vyplývajúcich z ustanovení o kvalite a zložení, určených zákonom, iným právnym predpisom alebo administratívnym opatrením, ktoré majú byť vykonané pomocou metód spoločenstva na vzorkovanie a analýzy;

keďže je potrebné určiť metódu spoločenstva na analýzu doplnkovej látky halofuginonu, ktorá by sa mala používať na kontrolu splnenia podmienok pre jeho používanie vo výžive zvierat;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

Článok 1

Členské štáty budú požadovať, aby analýzy obsahu halofuginonu na účely úradných kontrol krmív boli vykonané pomocou metódy opísanej v prílohe tejto smernice.

Článok 2

Členské štáty prijímú zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou do 30. júna 1994. Bezodkladne budú o tom informovať Komisiu.

Keď členské štáty prijímú tieto ustanovenia, tieto budú obsahovať odkaz na túto smernicu alebo budú doplnené týmto odkazom v čase ich úradného uverejnenia. Postup pre tento odkaz schvália členské štáty.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 28. júla 1993

Za Komisiu

René STEICHEN

člen Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 362, 31.12.1985, s. 8.

PRÍLOHA

URČENIE HALOFUGINONU

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-chinazolin-4-(3H)-hydrobromid

1. Účel a rozsah

Metóda slúži na stanovenie halofuginonu v krmivách. Dolný limit stanovenia je 1 mg/kg.

2. Podstata metódy

Po úprave horúcou vodou sa halofuginon extrahuje ako voľná zásada do octanu etylnatého a následne sa oddelí vo forme hydrochloridu do vodného roztoku kyseliny. Extrakt sa prečistí ióno – výmennou chromatografiou. Obsah halofuginonu sa stanoví vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) na reverznej fáze pomocou UV detektora.

3. Činidlá

3.1. Acetonitril, čistoty HPLC

3.2. Živica amberlitu XAD - 2

3.3. Octan amónny

3.4. Octan etylnatý

3.5. Ladová kyselina octová

3.6. Štandard halofuginonu (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-chinazolin-4-(3H)-hydrobromid, E 764)

3.6.1. Štandardný zásobný roztok halofuginonu, 100 µg/ml

Odvážte 50 mg halofuginonu s presnosťou 0,1 mg (3.6.) do odmernej banky o objeme 500 ml, rozpustíte v tlmivom roztoku octanu amónneho (3.18.), doplňte po značku tlmivým roztokom a premiešajte. Tento roztok je stály počas troch týždňov pri teplote 5 °C, ak je uložený v tme.

3.6.2. Kalibračné roztoky

Do série odmerných baniek o objeme 100 ml napipetujte 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 ml štandardného zásobného roztoku (3.6.1.). Doplníte po značku mobilnou fázou (3.21.) a premiešajte. Koncentrácia halofuginonu v týchto roztokoch je 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 resp. 6,0 µg/ml. Tieto roztoky musia byť pred použitím čerstvo pripravené.

3.7. Kyselina chlorovodíková (ρ_{20} približne 1,16 g/ml).

3.8. Metanol

3.9. Dusičnan strieborný

3.10. Askorbát sodný

3.11. Uhličitan sodný

3.12. Chlorid sodný

3.13. EDTA (kyselina etylendiaminotetraoctová, dvojsodná soľ)

3.14. Voda, čistoty HPLC

3.15. Roztok uhličitanu sodného, $\delta = 10$ g/100 ml

3.16. Roztok uhličitanu sodného nasýteného chloridom sodným, $\delta = 5$ g/100 ml

Vo vode rozpustíte 50 g uhličitanu sodného (3.11.), doplňte vodou do 1 l a pridávajte chlorid sodný (3.12.), kým sa roztok nenasytí.

3.17. Kyselina chlorovodíková, približne 0,1 mol/l

Zriedíte 10 ml HCl (3.7.) s vodou na objem 1 l.

3.18. Tlmivý roztok octanu amónneho, pH približne 0,25

Rozpustíte 19,3 g octanu amónneho (3.3.) a 30 ml kyseliny octovej (3.5.) vo vode (3.14.) a doplňte vodou do 1 l.

3.19. Príprava živice amberlitu XAD - 2

Premývajte vodou vhodné množstvo amberlitu (3.2.), kým neodstránite všetky ióny chloridu, čo sa overí skúškou dusičnanom strieborným (3.20.), test vykonajte v odstránenej vodnej fáze. Potom premyte živicu 50 ml metanolu (3.8.), odstráňte metanol a živicu uchovávajte pod čerstvým metanolom.

3.20. Roztok dusičnanu strieborného, približne 0,1 mol/l

Rozpustíte 0,17 g dusičnanu strieborného (3.9.) v 10 ml vody.

3.21. Mobilná fáza HPLC

Zmiešajte 500 ml acetonitrilu (3.1.) s 300 ml tlmivého roztoku octanu amónneho (3.18.) a s 1 200 ml vody (3.14.). Upravte hodnotu pH na 4,3 pomocou kyseliny octovej (3.5.). Prefiltrujte cez 0,22 µm filter (4.8.) a zbavte roztok plynu (napr. pôsobením ultrazvuku počas 10 minút). Tento roztok je stály počas jedného mesiaca, ak je uložený v tme a v uzavretej nádobe.

4. Prístroje

4.1. Ultrazvukový kúpeľ

4.2. Rotačná vákuová odparka

4.3. Odstredivka

4.4. HPLC (vysokoúčinný kvapalinový chromatograf) s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s diode – array detektorom

4.4.1. Kvapalinová chromatografická kolóna, 300 mm x 4 mm, C 18, s náplňou 10 µm alebo ekvivalentná kolóna

4.5. Sklenená kolóna (300 mm x 10 mm) vybavená fritovým filtrom a uzatváracím kohútom

4.6. Filtre so sklenými vláknami, priemer 150 mm

4.7. Membránové filtre, 0,45 µm

4.8. Membránové filtre, 0,22 µm

5. Postup

Upozornenie: halofuginon ako voľná zásada je nestály v alkalických roztokoch a v roztokoch obsahujúcich octan etylnatý. V octane etylnatom nesmie zostať dlhšie ako 30 minút.

5.1. Všeobecne

5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva, v ktorom nesmie byť prítomný ani halofuginon, ani interferujúce látky.

5.1.2. Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo halofuginonu, aké sa nachádza vo vzorke. K príprave vzorky o obsahu halofuginonu 3 mg/kg pridajte 300 µl štandardného zásobného roztoku (3.6.1.) do 10 g slepej vzorky krmiva, premiešajte a počkajte 10 minút, kým začnete s extrakciou (5.2.).

Upozornenie: Na účely tejto metódy slepá vzorka krmiva musí byť typovo podobná vzorke skúšanej a pri analýze v nej nesmie byť zistená prítomnosť halofuginonu.

5.2. Extrakcia

Do odstredivkovej skúmavky o objeme 200 ml navážte 10 g pripravenej vzorky s presnosťou 0,1 g, pridajte 0,5 g askorbátu sodného (3.10.), 0,5 g EDTA (3.13.) a 20 ml vody a premiešajte. Skúmavku ponorte na 5 minút do vodného kúpeľa (80 °C). Po ochladení na izbovú teplotu pridajte 20 ml roztoku uhličitanu sodného (3.15.) a premiešajte. Okamžite pridajte 100 ml octanu etylnatého (3.4.) a silno pretrepávajte rukou počas 15 sekúnd. Potom umiestnite skúmavku na tri minúty do ultrazvukového kúpeľa (4.1.) bez zátky. Odstreďujte počas dvoch minút a prelejte octanovú fázu cez filter so sklenými vláknami (4.6.) do 500 ml oddeľovacieho lievika. Zopakujte extrakciu vzorky s ďalšou 100 ml dávkou octanu etylnatého. Spojené extrakty premývajte počas jednej minúty 50 ml roztoku uhličitanu sodného nasýteného chloridom sodným (3.16.) a odstráňte vodnú vrstvu.

Extrahujte organickú vrstvu počas 1 minúty pomocou 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.17.). Spodnú vrstvu kyseliny zlejte do 250 ml oddeľovacieho lievika. Znovu extrahujte organickú vrstvu počas 1,5 minúty pomocou ďalších 50 ml kyseliny chlorovodíkovej a zmiešajte s prvým extraktom. Spojené kyselinové extrakty premývajte asi počas 10 sekúnd 10 ml octanu etylnatého (3.4.) vírivým pohybom.

Kvantitatívne preneste vodnú vrstvu do 250 ml banky s guľatým dnom a odstráňte organickú fázu. Odparte všetok zvyšný octan etylnatý z kyselinového roztoku pomocou rotačnej vákuovej odparky (2.4.). Teplota vodného kúpeľa nemá presiahnuť 40 °C. Vo vákuu cca 25 mbar sa všetok zvyšný octan etylnatý odstráni do 5 minút pri teplote 38 °C.

5.3. Prečistenie

5.3.1. Príprava kolóny s amberlitom

Kolóna XAD - 2 sa pripravuje pre každý extrakt vzorky. Vložte 10 g pripraveného amberlitu (3.19.) do sklenenej kolóny (4.5.) s metanolom (3.8.). Pridajte malý kúsok sklenej vaty do hornej časti živicového stĺpca. Vypustite metanol z kolóny a premyte živicu 100 ml vody, pričom vypúšťanie zastavte, keď kvapalina dosiahne vrch živicového stĺpca. Pred použitím nechajte kolónu stáť 10 minút na dosiahnutie rovnováhy. Nikdy nedovoľte, aby kolóna vyschla.

5.3.2. Prečistenie vzorky:

Preneste extrakt (5.2.) kvantitatívne do hornej časti pripraveného stĺpca amberlitu (5.3.1.), spustite vymývanie a eluát vylejte. Rýchlosť vymývania nemá presiahnuť 20 ml/min. Vypláchnite banku s guľatým dnom 20 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.17.), ktorou neskôr premyte stĺpec živice. Všetok zvyšný kyselinový roztok odstráňte pomocou prúdu vzduchu. Premývacie kvapaliny vylejte. Pridajte na kolónu 100 ml metanolu (3.8.), nechajte vymývať 5 až 10 ml, eluát zachyťte do 250 ml banky s guľatým dnom. Zvyšný metanol nechajte spolupôsobiť so živicom 10 minút, aby sa dosiahla rovnováha, pokračujte vo vymývaní s rýchlosťou nepresahujúcou 20 ml/min., eluát zachyťte do tej istej banky s guľatým dnom. Odparte metanol na rotačnej vákuovej odparke (4.2.), pričom teplota vodného kúpeľa nesmie presiahnuť 40 °C. Rozpustite zvyšok v mobilnej fáze a kvantitatívne preneste do 10 ml kalibrovannej banky. Doplnite po značku mobilnou fázou a premiešajte. Prefiltrujte alikvotnú časť cez membránový filter (4.7.). Tento roztok si nechajte na stanovenie pomocou HPLC (5.4.).

5.4. HPLC stanovenie

5.4.1. Parametre

Nasledujúce podmienky majú slúžiť ako usmerňujúce. Môžete použiť aj iné podmienky, ak poskytujú rovnaké výsledky.

Kvapalinová chromatografická kolóna (4.4.1.)

Mobilná fáza HPLC (3.21.)

Prietoková rýchlosť: 1,5 až 2 ml/min

Detekčná vlnová dĺžka: 243 nm

Objem nástreku: 40 až 100 µl.

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.6.2.) obsahujúci 3,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky (alebo plochy) píkovo a retenčné časy.

5.4.2. Kalibračná krivka

Nastrekajte každý kalibračný roztok (3.6.2.) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použijete priemerné výšky alebo plochy píkovo kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

5.4.3. Roztok vzorky

Niekoľkokrát nastrekajte extrakt vzorky (5.3.2.), pričom použijete rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch a určite z nameraných píkovo priemernú výšku (plochu) píku halofuginonu.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku z píkovo halofuginonu v roztoku vzorky sa porovnaním s kalibračnou krivkou (5.4.2.) určí koncentrácia halofuginonu vo vzorke v µg/ml.

Obsah halofuginónu w (mg/kg) vzorky je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde:

c: koncentrácia halofuginonu v roztoku vzorky v µg/ml,

m: hmotnosť navážky vzorky v gramoch.

7. Overenie výsledkov

7.1. Zhodnosť

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť paralelnou chromatografiou alebo použitím diode – array detektora, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.6.2) obsahujúceho 6,0 µg/ml.

7.1.1. Paralelná chromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.6.2.). Množstvo pridaného halofuginonu má byť podobné odhadovanému množstvu halofuginonu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku halofuginonu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť v rozpätí ± 10 % pôvodnej šírky.

7.1.2. Diode – array detekcia

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- vlnová dĺžka maximálnej absorpcie vzorky a štandardných spektier zaznamenaných pri vrchole píku chromatogramu musí byť rovnaká v rozsahu určenom rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade diode – array detekcie sa obyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm;
- spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v časti spektra medzi 225 a 300 nm v rozsahu od 10 a 100 % relatívnej absorpcie. Táto požiadavka je splnená, keď sú prítomné tiež isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorpcie analytu štandardu;
- spektrá stúpajúcej časti absorpčnej krivky, vrcholu a klesajúcej časti absorpčnej krivky píku vytvorené extraktom vzorky, sa nesmú odlišovať od ostatných častí spektra halofuginonu medzi 225 a 300 nm v rozsahu od 10 do 100 % relatívnej absorpcie. Táto požiadavka je splnená, ak sú prítomné rovnaké maximá a ak vo všetkých sledovaných bodoch odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorpcie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nie je splnené, prítomnosť analytu nebola potvrdená.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch súbežných zisťovaní vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,5 mg/kg pre obsah halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. Návratnosť

Výsledky kruhového testu

8. Bol usporiadaný kruhový test ⁽¹⁾, v ktorom osem laboratórií analyzovalo tri vzorky.

Výsledky

Výsledky

	Vzorka A (slepá) pri prijatí	Vzorka B (sypká)		Vzorka C (granulovaná)	
		pri prijatí	po dvoch mesiacoch	pri prijatí	po dvoch mesiacoch
Priemer ⁽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.: nezistené

S_R: štandardná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R: variačný koeficient (%)

rec.: návratnosť (%)

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