31993L0070

1993.9.17. *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* L 234/17

# A BIZOTTSÁG 93/70/EGK TIZENEGYEDIK IRÁNYELVE

**(1993. július 28.)**

**a takarmányok hatósági ellenőrzésére szolgáló közösségi analitikai módszerek meghatározásáról**

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb a 3768/85/EGK rendelettel ([1]) módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK tanácsi irányelvre ([2]) és különösen annak 2. cikkére,

mivel a 70/373/EGK irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti vagy közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;

mivel a halofuginon adalékanyag takarmányozásban történő felhasználására vonatkozó feltételek teljesítésének ellenőrzésére közösségi analitikai módszert kell meghatározni;

mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

*1. cikk*

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok halofuginon-tartalmának hatósági ellenőrzésére szolgáló analitikai vizsgálatokat ezen irányelv mellékletében előírt módszerek alkalmazásával kell végrehajtani.

*2. cikk*

A tagállamok 1994. június 30-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ezen irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az rendelkezéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

*3. cikk*

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1993. július 28-án.

*a Bizottság részéről*

René STEICHEN

*a Bizottság tagja*

([1]) HL L 362., 1985.12.31., 8. o.
([2]) HL L 170., 1970.8.3., 2. o.

*MELLÉKLET*

## A HALOFUGINON MEGHATÁROZÁSA

DL-transz-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-quinazolin-4-(3H)-egy hidrobromid

1. **Cél és alkalmazási terület**

A módszer a halofuginon takarmányokban történő meghatározására szolgál. A meghatározás alsó határa 1 mg/kg.

2. **Vizsgálati alapelv**

Forró vízzel történt kezelés után a halofuginont szabad bázis formában etilén-acetátba extraháljuk, ezt követően pedig hidroklorid formában vizes savoldatba partícionáljuk. A kivonatot ioncserélő kromatográfiával tisztítjuk. A halofuginon-tartalom meghatározását fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel és UV detektor alkalmazásával végezzük.

3. **Reagensek**

3.1. Acetonitril, HPLC minőségű

3.2. Amberlite XAD-2 műgyanta

3.3. Ammónium-acetát

3.4. Etil-acetát

3.5. Jégecet

3.6. Halofuginon standard anyag (DL-transz-7-bromo-6-kloro-3-[3-hidroxi-2-piperidil)acetonil] quinazolin-4-(3H)-egy hidrobromid, E 764)

3.6.1. Halofuginon standard törzsoldat, 100 µg/ml

Mérjünk be egy 500 ml-es mérőlombikba 0,1 mg pontossággal 50 mg halofuginont (3.6.), oldjuk fel ammónium-acetát pufferoldatban (3.18.), töltsük fel a lombikot jelig a pufferoldattal, majd keverjük el. Ezen oldat 5 °C hőmérsékleten és sötétben tárolva három héten át stabil marad.

3.6.2. Kalibráló oldatok

100 ml-es mérőlombikokba adagoljunk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 és 6,0 ml standard törzsoldatot (3.6.1.). A mobil fázissal töltsük fel jelig (3.21.), és keverjük el. Ezen oldatok halofuginon-koncentrációja 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, illetve 6,0 µg/ml lesz. Az oldatokat használat előtt frissen kell elkészíteni.

3.7. Sósav ($\rho_{20}$ megközelítőleg 1,16 g/ml)

3.8. Metil-alkohol

3.9. Ezüst-nitrát

3.10. Nátrium-aszkorbát

3.11. Nátrium-karbonát

3.12. Nátrium-klorid

3.13. EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav, dinátrium só)

3.14. Víz, HPLC minőségű

3.15. Nátrium-karbonát oldat, $\beta$ = 10 g/100 ml

3.16. Nátrium-kloriddal telített nátrium-karbonát oldat, $\beta$ = 5 g/100 ml

Oldjunk fel 50 g nátrium-karbonátot (3.11.) vízben, hígítsuk fel 1 literre, és adjunk hozzá nátrium-kloridot (3.12.), amíg az oldat telített nem lesz.

3.17. Sósav, megközelítőleg 0,1 mol/l

10 ml HCl-t (3.7.) hígítsunk vízzel egy literre.

3.18. Ammónium-acetát pufferoldat, megközelítőleg 0,25 mol/l

Oldjunk fel 19,3 g ammónium-acetátot (3.3.) és 30 ml ecetsavat (3.5.) vízben (3.14.), és hígítsuk 1 literre.

3.19. Amberlite XAD-2 műgyanta előkészítése

Megfelelő mennyiségű Amberlite-et (3.2.) mossunk addig vízzel, amíg az összes kloridiont el nem távolítottuk, mindezt ezüst-nitrátnak (3.20.) az elöntött vizes fázishoz való hozzáadásával ellenőrizhetjük. Ezután mossuk ki a gyantát 50 ml metil-alkoholban (3.8.), öntsük le a metil-alkoholt, és a gyantát friss metil-alkohol alatt tároljuk.

3.20. Ezüst-nitrát oldat, megközelítőleg 0,1 mol/l

Oldjunk fel 0,17 g ezüst-nitrátot (3.9.) 10 ml vízben.

3.21. HPLC mobil fázis

Keverjünk el 500 ml acetonitrilt (3.1.) 300 ml ammónium-acetát pufferoldattal (3.18.) és 1 200 ml vízzel (3.14.). Az oldat pH-ját ecetsavval (3.5.) állítsuk be 4,3-ra. Szűrjük meg egy 0,22 μm lyukátmérőjű szűrőn (4.8.), majd gázmentesítsük az oldatot (például tízperces ultrahangos kezeléssel). Az oldat egy hónapon át stabil marad, ha zárt edényben, sötétben tároljuk.

4. **Eszközök**

4.1. Ultrahangos fürdő

4.2. Rotációs, vékonyfilmes bepárló

4.3. Centrifuga

4.4. HPLC készülék változtatható hullámhosszon mérő UV detektorral vagy dióda-soros detektorral

4.4.1. Folyadékkromatográfiás oszlop, 300 mm × 4 mm, C 18, 10 μm-es töltet, vagy egy ezzel egyenértékű oszlop

4.5. Zsugorított üvegszűrővel és elzárócsappal ellátott üvegoszlop (300 mm × 10 mm)

4.6. Üvegszálas szűrők, 150 mm-es átmérővel

4.7. Membránszűrők, 0,45 μm-es lyukátmérővel

4.8. Membránszűrők, 0,22 μm-es lyukátmérővel

5. **A vizsgálat módja**

*Megjegyzés:* A halofuginon szabad bázis formájában nem stabil a lúgos és etil-acetát oldatokban. Harminc percnél tovább nem maradhat etil-acetátban.

5.1. Általános tudnivalók

5.1.1. Végezzünk vakpróbát egy referenciamintán annak ellenőrzésére, hogy sem halofuginon, sem interferáló anyagok nincsenek jelen.

5.1.2. A mintában találhatóval azonos mennyiségű halofuginon hozzáadásával dúsított referenciaminta analízisével végezzünk visszanyerési próbát. A 3 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz, adjunk 300 μl standard törzsoldatot (3.6.1.) 10 g referenciamintához, keverjük össze, majd várjunk 10 percet, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrahálással (5.2.).

*Megjegyzés:* ennél a módszernél a referenciaminta a mintával azonos fajtájú takarmány legyen, és benne az analízis során halofuginon ne legyen kimutatható.

5.2. Extrahálás

Egy 200 ml-es centrifugacsőbe 0,1 g-os pontossággal mérjünk ki 10 g-ot az előkészített mintából, adjunk hozzá 0,5 g nátrium-aszkorbátot (3.10.), 0,5 g EDTA oldatot (3.13.) és 20 ml vizet, majd keverjük össze. A csövet helyezzük öt percre egy 80 °C-os vízfürdőbe. Miután visszahűlt szobahőmérsékletre, adjunk hozzá 20 ml nátrium-karbonát oldatot (3.15.), és keverjük össze. Közvetlenül ezután adjunk hozzá 100 ml etil-acetátot (3.4.), és kézzel erősen rázzuk 15 másodpercen keresztül. Ezután tegyük a csövet három percig az ultrahangos fürdőbe (4.1.), és lazítsuk meg a dugóját. Centrifugáljuk két percen át, majd dekantáljuk az etil-acetát fázist egy üvegszálas szűrőn (4.6.) keresztül egy 500 ml-es választótölcsérbe. Ismételjük meg az extrahálást a mintán egy második 100 ml-es etil-acetát adaggal. Mossuk az elegyített kivonatot 50 ml nátrium-kloriddal telített nátrium-karbonát oldattal (3.16.) egy percen keresztül, és a vizes fázist öntsük el.

A szerves réteget 1 percen keresztül 50 ml sósavval (3.17.) extraháljuk. Az alsó savas réteget eresszük le egy 250 ml-es választótölcsérbe. A szerves réteget ismételten extraháljuk másfél percen keresztül további 50 ml sósavval, és elegyítsük az első kivonattal. Mossuk az elegyített savas kivonatokat úgy, hogy megközelítőleg tíz másodpercig locsoljuk 10 ml etil-acetáttal (3.4.).

A vizes réteget teljes mennyiségben vigyük át egy 250 ml-es gömblombikba, és öntsük el a szerves fázist. A rotációs, vékonyfilmes bepárlókészülékkel (2.4.) párologtassuk el az összes visszamaradó etil-acetátot a savas oldatból. A vízfürdő hőmérséklete nem haladhatja meg a 40 °C-ot. Körülbelül 25 mbar vákuumban 38 °C-on az összes visszamaradt etil-acetát öt perc alatt elpárolog.

5.3. Tisztítás

5.3.1. Az Amberlite oszlop előkészítése

Minden mintakivonat számára külön XAD-2 oszlopot készítünk. Vigyünk át metil-alkohollal (3.8.) 10 g előkészített Amberlite-et (3.19.) egy üvegoszlopba (4.5.). A gyantaágy tetejére tegyünk egy kis üvegvatta dugót. Eresszük le az oszlopról a metil-alkoholt, és 100 ml vízzel mossuk el a gyantát, de állítsuk meg az átfolyást, amikor a folyadék elérte a gyantaágy tetejét. Használat előtt, 10 percig engedjük, hogy az oszlop egyensúlyba kerüljön. Soha ne hagyjuk az oszlopot kiszáradni.

5.3.2. A minta tisztítása

A kivonatot (5.2.) teljes mennyiségben vigyük át az előkészített Amberlite oszlop (5.3.1.) tetejére, eluáljuk, majd az eluátumot öntsük el. Az eluálás sebessége nem lehet több, mint 20 ml/min. Öblítsük el a gömblombikot 20 ml sósavval (3.17.), és ezt használjuk a gyantaoszlop elmosásához is. Légbefúvással távolítsunk el minden savoldat-maradékot. A mosóoldatot öntsük el. Adjunk 100 ml metil-alkoholt (3.8.) az oszlopra, és engedjünk 5–10 ml-t eluálódni, miközben az eluátumot egy 250 ml-es gömblombikban fogjuk fel. Tíz percig hagyjuk, hogy a maradék metil-alkohol egyensúlyba kerüljön a műgyantával, majd folytassuk az eluálást maximum 20 ml/min sebességen, miközben az eluátumot ugyanabban a gömblombikban fogjuk fel. A metil-alkoholt a rotációs, vékonyfilmes bepárlókészüléken párologtassuk el (4.2.), a vízfürdő hőmérséklete nem haladhatja meg a 40 °C-ot. A maradékot a mobil fázis (3.21.) segítségével teljes mennyiségben vigyük át egy 10 ml-es mérőlombikba. Mobil fázissal töltsük fel jelig, és keverjük el. Egy aliquot részt szűrjünk át egy membránszűrőn (4.7.). Ezt az oldatot tegyük el a HPLC meghatározáshoz (5.4.)

5.4. HPLC meghatározás

5.4.1. Paraméterek

Az alábbi vizsgálati feltételek csak iránymutatóul szolgálnak, ettől eltérő feltételeket is lehet használni, amennyiben azok ezzel egyenértékű eredményt adnak.

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.4.1.)

HPLC mobil fázis (3.21.)

Átáramlási sebesség: 1,5–2 ml/min

Észlelési hullámhossz: 243 nm

Befecskendezett mennyiség: 40–100 µl

A 3,0 µg/ml koncentrációjú kalibráló oldat (3.6.2.) többszöri befecskendezésével ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását, amíg a csúcsok magassága (vagy görbe alatti területe) és a retenciós idők stabilakká nem válnak.

5.4.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször egymás után az egyes kalibráló oldatokat (3.6.2.), és mérjük meg az egyes koncentrációkra eső csúcsok magasságát (a görbék alatti területet). A kalibráló oldatok csúcsainak átlagos magassága vagy görbe alatti területe legyen az ordináta tengelyen, a megfelelő koncentrációk µg/ml-ben az abszcisszán, és ennek alapján szerkesszük meg a kalibrációs görbét.

5.4.3. Mintaoldat

Ugyanolyan mennyiségű oldatot használva, mint amennyit a kalibráló oldatokhoz használtunk, fecskendezzük be a mintakivonatot (5.3.2.) egymás után többször és határozzuk meg a halofuginon-csúcsok átlagos magasságát (görbe alatti területét).

6. **Az eredmények kiszámítása**

A mintaoldat halofuginon-csúcsainak átlagos magasságát (görbe alatti területét) a kalibrációs görbével (5.4.2.) egybevetve, határozzuk meg a mintaoldat koncentrációját µg/ml-ben.

A minta, w (mg/kg)-ben kifejezett halofuginon-tartalmát az alábbi képlet segítségével kapjuk meg:

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

amelyben:

– c: a mintaoldat halofuginon-koncentrációja, µg/ml-ben,

– m: a mintadarab tömege grammban.

7. **Az eredmények validálása**

7.1. Azonosítás

Az analizált anyag azonosítását párhuzamos kromatográfiával vagy diódasoros detektorral lehet megerősíteni, amely során a mintakivonat és a 6,0 μg/ml koncentrációjú kalibráló oldat (3.6.2.) spektrumát hasonlítjuk össze.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

A mintakivonatot a kalibráló oldat (3.6.2.) megfelelő mennyiségének hozzáadásával dúsítjuk. A hozzáadott halofuginon mennyiségének a mintakivonatban található halofuginon becsült mennyiségével azonosnak kell lennie.

A hozzáadott mennyiség és a kivonat hígításának figyelembe vétele után csak a halofuginon-csúcs emelkedhet. A csúcs szélességének, a legnagyobb magasság felénél, az eredeti szélesség ± 10 %-án belül kell lennie.

7.1.2. Diódasoros kimutatás

Az eredményeket az alábbi kritériumok alapján kell értékelni:

a) a mintának és a standard spektrumoknak, a kromatogram görbe csúcsán rögzített legnagyobb elnyelési hullámhossza, az észlelőrendszer felbontási képessége alapján meghatározott tűréshatáron belül, meg kell, hogy egyezzen. A diódasoros kimutatásnál ez tipikus esetben ± 2 nm-en belül van;

b) 225 és 300 nm között a minta és a standard a kromatogram görbe csúcsán rögzített mért spektruma, a spektrum ezen részein nem térhet el egymástól a relatív elnyelés 10 és 100 %-a közötti tartományban. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximum értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a standard minta elnyelésének 15 %-ánál nagyobb mértékben egymástól;

c) 225 és 300 nm között a mintakivonat által képzett görbe felszálló ága, csúcsa és leszálló ága a spektrumnak ezen részein a relatív elnyelés 10 és 100 %-a közötti tartományban nem térhet el egymástól. Ez a kritérium akkor teljesül, ha ugyanazok a maximum értékek vannak jelen, és a két spektrum egyetlen észlelési ponton sem tér el a csúcspont abszorpciós spektrumának 15 %-nál nagyobb mértékben.

Ha ezen kritériumok közül egy nem teljesül, az analizált anyag jelentétét nem sikerült megerősíteni.

7.2. Ismételhetőség

Két azonos mintán végzett, párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség 3 mg/kg halofuginon-tartalomig nem lehet több, mint 0,5 mg/kg.

7.3. Visszanyerés

A dúsított referenciaminta esetében legalább 80 %-os visszanyerési arányt kell elérni.

8. **Kollaborációs vizsgálat eredményei**

Egy kollaborációs vizsgálat ([1]) során három mintát analizáltak nyolc laboratóriumban.

**Eredmények**

| | A-minta (vak) átvételkor | B-minta (takarmányliszt) | | C-minta (granulátum) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | átvételkor | két hónap után | átvételkor | két hónap után |
| Középérték ([1]) | n.k. | 2,80 | 2,42 | 2,89 | 2,45 |
| $S_R$ | – | 0,45 | 0,43 | 0,40 | 0,42 |
| $CV_R$ | – | 16 | 18 | 14 | 17 |
| vissza | | 86 | 74 | 88 | 75 |

([1]): egységek mg/kg-ban.
n.k.: nem kimutatható.
$S_R$: reprodukálhatóság szórása.
$CV_R$: variációs együttható (%).
vissza: visszanyerési százalék (%).

([1]) *The Analyst* 108., 1983., 1252–1256. o.