31993L0070

17.9.1993 *ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ* L 234/17

# ЕДИНАДЕСЕТА ДИРЕКТИВА 93/70/ЕИО НА КОМИСИЯТА
## от 28 юли 1993 година
## за установяване на общностни методи за анализ за целите на официалния контрол на храните за животни

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на общностни методи за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ([1]), последно изменена с Регламент (ЕИО) № 3768/85 ([2]), и по-специално член 2 от нея,

като има предвид, че Директива 70/373/ЕИО изисква официален контрол на храните за животни с цел проверка на съответствието с изискванията, които възникват във връзка с разпоредбите за качеството и състава, предвидени със законов, подзаконов или административен акт, да се осъществява като се използват методите на Общността за вземане на проби и анализ;

като има предвид, че трябва да се установи метод на Общността за анализ на добавката халофугинон, който да се използва за проверяване на съответствието с условията за неговото използване при храненето на животните;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

*Член 1*

Държавите-членки изискват анализите за съдържанието на халофугинон, за целите на официалните проверки на храните за животни, да се извършват като се използват методите, описани в настоящото приложение.

*Член 2*

Държавите-членки въвеждат в сила законовите, подзаконовите и административните разпоредби, необходими, за да се съобразят с настоящата директива преди 30 юни 1994 г. Те информират незабавно Комисията за това.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа позоваване на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Условията и редът на позоваване се определят от държавите-членки.

*Член 3*

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 28 юли 1993 година.

*За Комисията*

René STEICHEN

*Член на Комисията*

([1]) ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.
([2]) ОВ L 362, 31.12.1985 г., стр. 8.

*ПРИЛОЖЕНИЕ*

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХАЛОФУГИНОН

DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-(3-хидрокси-2-пиперидил)ацетонил]-квиназолин-4-(3H)-на хидробромид.

1. **Цел и обхват**

Методът се използва за определянето на халофугинон в храните за животни. Долната граница за определянето е 1 mg/kg.

2. **Принцип**

След третиране с гореща вода, халофугинонът се екстрахира като свободна основа в етилов ацетат и след това се разделя като хидрохлорид във воден киселинен разтвор. Екстрактът се очиства посредством хроматография с йонен обмен. Съдържанието на халофугинона се определя посредством високочестотна хроматография със запазена фаза (HPLC), като се използва детектор на ултравиолетови лъчи.

3. **Реагенти**

3.1. Ацетонитрил, клас HPLC

3.2. Амберлит XAD-2 смола

3.3. Амониев ацетат

3.4. Етилов ацетат

3.5. Оцетна киселина, глациална (във формата на лед)

3.6. Халофугинон - стандартна субстанция (DL-транс-7-бромо-6-хлоро-3-[3-(3-хидрокси-2-пиперидил) ацетонил]-квиназолин-4-(3H)-на хидробромид, E 764)

3.6.1. Фондов стандартен разтвор на халофугинон, 100 µg/ml

Претеглят се с точност до 0,1 mg 50 mg халофугинон (3.6) в градуирана колба с вместимост 500 ml, разтворете в буферен разтвор на амониев ацетат (3.18), допълва се до маркировката с буферен разтвор и се смесва. Този разтвор остава стабилен в продължение на три седмици при температура 5 °C, при положение че се съхранява на тъмно.

3.6.2. Разтвори за калиброване

В една поредица от градирани колби с вместимост 100 ml, се прехвърлят 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 6,0 ml от фондовия стандартен разтвор на халофугинон (3.6.1). Допълва се до маркировката с подвижна фаза (3.21) и се смесва. Разтворите ще имат съответно концентрации на халофугинон 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 6,0 µl. Тези разтвори трябва да са прясно приготвени, преди употреба.

3.7. Хидрохлорна (солна) киселина (r20 - в концентрация приблизително 1,16 g/ml).

3.8. Метанол

3.9. Сребърен нитрат

3.10. Натриев аскорбат

3.11. Натриев карбонат

3.12. Натриев хлорид

3.13. EDTA (етилен-диамин-тетра-оцетна киселина, двунатриева сол)

3.14. Вода, клас HPLC

3.15. Разтвор на натриев карбонат, обем = 10 g/100 ml

3.16. Натриев хлорид - наситен разтвор на натриев карбонат, обем, равен на 5 g/100 ml

Разтварят се 50 g натриев карбонат (3.11) във вода, разрежда се до 1 l и се добавя натриев хлорид (3.12), докато се получи наситен разтвор.

3.17. Солна киселина, приблизително 0,1 mol/l.

Разтварят се 10 ml солна киселина (3.7) във вода, докато се получи 1 l.

3.18. Буферен разтвор на амониев ацетат, приблизително 0,25.

Разтварят се 19,3 g амониев ацетат (3.3) и 30 ml оцетна киселина (3.5) във вода (3.14) и се разреждат до 1 l.

3.19. Подготвяне на амберлит XAD-2 смола

Измива се подходящо количество амберлит (3.2) с вода, докато бъдат отстранени всички хлоридни йони, като това се индицира посредством теста със сребърен нитрат (3.20), който се изпълнява в изхвърлената течна фаза. След това смолата се измива с 50 ml метанол (3.8), изхвърля се метанолът и се съхранява смолата под свеж метанол.

3.20. Разтвор на сребърен нитрат, приблизително 0,1 mol/l.

Разтворят се 0,17 g сребърен нитрат (3.9) в 10 ml вода.

3.21. Подвижна фаза HPLC

Смесват се 500 ml ацетонитрил (3.1) с 300 ml буферен разтвор на амониев ацетат (3.3) и 1200 ml вода (3.14). Киселинността се регулира на pH = 4,3, като се използва оцетна киселина (3.5). Филтрира се през филтър 0,22 μm (4.8) и разтворът се дегазира (напр. посредством почистване с ултразвук в продължение на 10 min). Този разтвор остава стабилен в продължение на един месец, при положение че се съхранява на тъмно място в затворен съд.

4. **Апаратура**

4.1. Ултразвукова баня

4.2. Ротационен филмов (тънкослоен) изпарител

4.3. Центрофуга

4.4. Оборудване HPLC, което има детектор на ултравиолетови лъчи с променлива дължина на вълната или детектор с диодна решетка.

4.4.1. Течна хроматографска колона, 300 mm > 4 mm, C 18, 10 μm опаковка, или еквивалентна колона

4.5. Стъклена колона (300 mm > 10 mm), снабдена с филтър от синтеровано стъкло и спирачно кранче.

4.6. Филтри от стъкловлакно, с диаметър 150 mm

4.7. Мембранни филтри 0,45 mm

4.8. Мембранни филтри 0,22 mm

5. **Процедура**

*Забележка:* Халофугинонът като свободна основа е нестабилен в разтвори на алкалин и на етилов ацетат, ако не остане в етиловия ацетат в продължение на повече от 30 min.

5.1. Общи положения

5.1.1. Анализира се храна без добавки (чиста храна), за да се провери и удостовери това, че не присъстват нито халофугинон, нито други включени субстанции.

5.1.2. Провежда се тест за възстановяване, като се анализира храната без хранителни добавки, която е била подсилена посредством добавянето на известно количество халофугинон, аналогично на това, което присъства в пробата. За да се подсили на ниво 3 mg/kg, се добавят 300 μl от фондовия стандартен разтвор (3.6.1), докато се получи 10 g от чистата храна, смесва се и се изчаква 10 min, преди да се продължи с екстрахирането (5.2).

*Бележка:* За целите на този метод чистата храна трябва да е аналогична по вид на тази от пробата и при анализа да не се открие халофугинон.

5.2. Екстрахиране

Претеглят се с точност до 0,1 g 10 g от подготвената проба в центрофужна тръбичка с вместимост 200 ml, добавят се 0,5 g натриев аскорбат (3.10), 0,5 g EDTA (етилен-диамин-тетра-оцетна киселина, двунатриева сол) (3.13) и 20 ml вода и се смесва. Тръбичката се поставя за 5 min във водна баня (80 °C). След охлаждане до стайна температура се добавят 20 ml разтвор на натриев карбонат (3.15) и се смесва. Незабавно се добавят 100 ml етилов ацетат (3.4) и се разклаща силно с ръка в продължение на 15 s. След това тръбичката се поставя за 3 min в ултразвукова баня (4.1) и се разхлабва запушалката. Центрофугира се в продължение на 2 min и се прелива фазата на етиловия ацетат през филтър от стъкловлакно (4.6) в разделителна фуния с вместимост 500 ml. Екстрахирането на пробата се повтаря с втора част от 100 ml етилов ацетат. Комбинираните екстракти се измиват в продължение на 1 min с 50 ml разтвор на натриев хлорид - наситен натриев карбонат (3.16) и се изхвърля водният слой.

Екстрахира се органичният слой в продължение на 1 min с 50 ml солна киселина (3.17). Оставя се долният слой на киселината да изтече в разделителна фуния с вместимост 250 ml. Повторно се екстрахира органичният слой в продължение на една минута и половина с нови 50 ml разтвор на натриев хлорид и се комбинира с първия екстракт. Измиват се комбинираните киселинни екстракти посредством завъртане в продължение на приблизително 10 s с 10 ml етилов ацетат (3.4).

Водният слой се прехвърля количествено в 250 ml колба с кръгло дъно и се изхвърля органичната фаза. Изпарява се целият останал етилов ацетат от киселинния разтвор, като се използва ротационен филмов (тънкослоен) изпарител (2.4). Температурата на водната баня не трябва да превишава 40 °C. Под вакуум от приблизително 25 mbar целият остатъчен етилов ацетат ще бъде отстранен в рамките на 5 min при температура 38 °C.

5.3. Почистване

5.3.1. Подготвяне на колоната с амберлит

За всеки екстракт на пробата се подготвя по една колона XAD-2. 10 g от подготвения амберлит се прехвърлят (3.19) в стъклена колона (4.5) с метанол (3.8). Добавя се една малка запушалка от стъклен памук в горната част на коритото от смола. Оставя се метанолът да изтече от колоната и смолата се измива със 100 ml вода, като потокът се спира веднага, щом течността достигне горната част на коритото от смола. Оставя се колоната да се уравновеси за 10 min преди употреба. Не се допуска колоната да изтече напълно до сухо.

5.3.2. Почистване на пробата

Екстрактът се прехвърля (5.2) количествено към горната част на подготвената колона от амберлит (5.3.1) и се отмива, като се изхвърля елюатът (отмитият разтвор). Скоростта на отмиване не трябва да превишава 20 ml/min. Колбата с кръгло дъно се изплаква с 20 ml солна киселина (3.17), която се използва и за да се измие колоната от смола. Евентуално останалият киселинен разтвор се продухва с въздушен поток. Изхвърлят се отмитите разтвори. Добавят се 100 ml метанол (3.8) към колоната и се оставя 5 до 10 min да изтече, като отмитият разтвор се събира в 250 ml колба с кръгло дъно. Оставя се останалият метанол за 10 min, за да влезе в равновесие със смолата, и се продължава отмиването със скорост 20 ml/min, като отмитият разтвор се събира в същата 250 ml колба с кръгло дъно. Изпарява се метанолът върху ротационния тънкослоен изпарител (4.2), като температурата на водната баня не трябва да превишава 40 °C . Остатъкът се прехвърля количествено в 10 ml калибрована колба, като се използва подвижната фаза (3.21). Долива се до маркировката с мобилната фаза и се смесва. Една аликвотна (кратна) част се филтрува през мембранен филтър (4.7). Този разтвор се запазва за определяне посредством високочестотна хроматография със запазена фаза HPLC (5.4).

5.4. Определяне посредством HPLC

5.4.1. Параметри

Следните условия се предлагат като ръководство, могат да се използват и други условия, при условие че с тях се получават еквивалентни резултати:

— течна хроматографска колона (4.4.1);

— мобилна фаза на HPLC (3.21);

— скорост на потока: 1,5 до 2 ml/min;

— дължина на вълната за откриване: 243 nm;

— обем за инжектиране: 40 до 100 µl;

— проверява се стабилността на хроматографската система, като се Инжектира калибриращият разтвор (3.6.2), съдържащ 3 µg/ml, няколко пъти, докато се постигне постоянна височина на пиковете (или участъците) и време на задържане.

5.4.2. Графика на калибриране

Всеки калибриращ разтвор се инжектира (3.6.2) няколко пъти и се измерват височините на пиковете (или участъците) за всяка концентрация. Начертава се графиката на калибриране, като се използват средните височини на пиковете (участъците) на калибриращите разтвори като ординати, а съответните концентрации в µg/ml като абсциси.

5.4.3. Разтвор на пробата

От пробата се инжектира (5.3.2) няколко пъти, като се използва същият обем, който е взет за калибриращите разтвори, и се определя средната височина на пиковете (участъкът) за халофугинона.

6. **Изчисляване на резултатите**

Концентрацията на разтвора на пробата в mg/ml се определя от средната височина (участък) на пиковете за халофугинона, като се използват препратки към графиката на калибрирането (5.4.2).

Съдържанието на халофугинона в тегловни проценти w (mg/kg) в пробата се дава със следната формула:

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

където:

— c: е концентрацията на халофугинона в разтвора на пробата в µg/ml,

— m: масата на изпробваната част в грамове.

7. **Потвърждаване на резултатите**

7.1. Идентичност

Идентичността на анализираната субстанция може да се потвърди посредством успоредна хроматография или като се използва детектор с диодна решетка, с който се сравняват спектрите на екстракта на пробата и на калибриращия разтвор (3.6.2), съдържащ 6,0 μg/ml.

7.1.1. Успоредна хроматография

Екстракт на пробата се подсилва посредством добавянето на едно целесъобразно количество калибриращ разтвор (3.6.2). Количеството на добавения халофугинон трябва да е аналогично на приблизителното количество на халофугинона, намерен в екстракта на пробата.

Само височината на пика на халофугинона следва да се увеличи, след като се вземе под внимание както добавеното количество, така и разреждането на екстракта. Широчината на пика, на половината от нейната максимална височина, трябва да бъде в рамките на ± 10 % от първоначалната широчина.

7.1.2. Откриване с диодна решетка

Резултатите се оценяват съобразно следните критерии:

а) дължината на вълната за максималната абсорбция на пробата и на стандартните спектри, записана при пиковия връх върху хроматограмата, трябва да е една и съща в рамките на едно поле, определено от разрешителната (разделителната) способност на системата за откриване, за откриване с диодна решетка, тази дължина на вълната е обикновено в рамките на ± 2 nm;

б) между 225 и 300 nm пробата и стандартните спектри, записани при пиковия връх на хроматограмата, не трябва да са различни за тези части на спектъра в рамките на обхвата от 10 до 100 % от относителната абсорбция, този критерий се счита за спазен, когато присъстват едни и същи максимуми и в никой от наблюдаваните пунктове отклонението между двата спектъра превишава 15 % от абсорбцията на стандартната анализирана субстанция;

в) между 225 и 300 nm спектрите на горния склон върхът и долният склон на пика, които се произвеждат от екстракта на пробата, не трябва да се различават помежду си за тези части от спектъра в рамките на обхвата от 10 до 100 % от относителната абсорбция; този критерий се счита за спазен, когато присъстват едни и същи максимуми и когато при всички наблюдавани пунктове отклонението между спектрите не превишава 15 % от абсорбцията на спектъра на върха.

Ако някой от тези критерии не бъде спазен, присъствието на анализираната субстанция не може да се счита за потвърдено.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, които се провеждат върху една и съща проба (мостра), не трябва да превишават 0,5 mg/kg за съдържание на халофугинон до 3 mg/kg.

7.3. Възстановяване

За подсилената чиста проба възстановяването е минимум 80 %.

8. **Резултати от съвместно изпитване**

Резултатите от съвместно изпитване ([1]), при което три проби са подложени на анализ от осем лаборатории, са представени в таблицата.

**Резултати**

| | Празна А при получаване | Проба В (брашно) | | Проба С (гранули) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | при получаване | следдва месеца | при получаване | след два месеца |
| Средна ([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 |
| Възстановяване | - | 86 | 74 | 88 | 75 |

([1]): единици в mg/kg
n.d.: не е открито
$S_R$: стандартно отклонение на повторяемост
$CV_R$: коефицент на вариация на повторяемостта (%)
Възстановяване: (%)

([1]) *The Analyst*, бр. 108, 1983 г., стр. 1252—1256.