393L0070

17.9.93 *EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING* Nr L 234/17

KOMMISSIONENS ELFTE DIREKTIV 93/70/EEG

av den 28 juli 1993

om gemenskapsmetoder för analys vid den officiella foderkontrollen

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen(1), senast ändrat genom förordning (EEG) nr 3768/85(2), särskilt artikel 2 i detta, och

med beaktande av följande:

Direktiv 70/373/EEG föreskriver att gemenskapsmetoderna för provtagning och analys skall användas vid den officiella foderkontrollen för att fastställa om fodret uppfyller de krav som fastställs i lagar och andra författningar om foderkvalitet och fodersammansättning.

För att kontrollera om halofuginon motsvarar kraven för att användas i djurfoder bör en gemenskapsmetod för analys fastställas för detta tillsatsämne.

Bestämmelserna i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Ständiga foderkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall kräva att analyser vid den officiella foderkontrollen skall utföras med den metod som beskrivs i bilagan till det här direktiv då det gäller halter av halofuginon.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv 1 senast den 30 juni 1994. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall dessa innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv anta.

Artikel 3

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 28 juli 1993.

På kommissionens vägnar

René STEICHEN

Ledamot av kommissionen

(1) EGT nr L 170, 3. 8. 1970, s. 2.
(2) EGT nr L 362, 31. 12. 1985, s. 8.

BILAGA

BESTÄMNING AV HALOFUGINON

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-quinazolin-4-(3H)-one hydrobromid

1. **Syfte och räckvidd**

Denna metod är avsedd för bestämning av halofuginon i foder. Lägsta gräns för bestämningen är 1 mg/kg.

2. **Princip**

Efter behandling med varmt vatten extraheras halofuginon som den fria basen med etylacetat och separeras därefter som hydroklor över i en vattnig syralösning. Extraktet renas genom jonbyteskromotografi. Halofuginonhalten bestäms genom omvänd-fas-vätskekromatografi (HPLC) med en UV-detektor.

3. **Reagens**

3.1. Acetonitril, HPLC-kvalitet.

3.2. Amberlit XAD-2 harts.

3.3. Ammoniumacetat.

3.4. Etylacetat.

3.5. Ättiksyra.

3.6. Halofuginon-standard (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-quinazolin-4-(3H)-one hydrobromid, E 764).

3.6.1. Halofuginon-standardlösning, 100 µg/ml.

Väg upp 50 mg halofuginon (3.6) med högst 0,1 mg avvikelse i en 500 ml mätkolv. Lös upp i ammoniumacetatbuffertlösning (3.18). Tillsätt buffertlösning till märket och blanda. Om denna lösning förvaras mörkt vid 5 °C är den stabil i tre veckor.

3.6.2. Kalibreringslösningar

För över 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 respektive 6,0 ml av standardlösningen (3.6.1) till en rad 100 ml mätkolvar. Tillsätt mobil fas (3.21) till märket och blanda. Dessa lösningar har halofuginonkoncentrationer på 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 respektive 6,0 µg/ml och måste beredas omedelbart innan de skall användas.

3.7. Saltsyra (ϱ_{20} ca. 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Silvernitrat.

3.10. Natriumaskorbat.

3.11. Natriumkarbonat.

3.12. Natriumklorid.

3.13. EDTA (etylendiamintetraättikasyra, dinatriumsalt).

3.14. Vatten av HPLC-kvalitet.

3.15. Natriumkarbonatlösning, ϑ = 10 g/100 ml.

3.16. Saltmättad natriumkarbonatlösning, ϑ = 5 g/100 ml.

Lös upp 50 g natriumkarbonat (3.11) i vatten. Späd till 1 l och tillsätt natriumklorid (3.12) tills lösningen är mättad.

3.17. Saltsyra, ca. 0,1 mol/l.

Späd 10 ml HCl (3.7) med vatten till 1 l.

3.18. Ammoniumacetatbuffertlösning, ca. 0,25 mol/l.

Lös upp 19,3 g ammoniumacetat (3.3) och 30 ml ättiksyra (3.5) i vatten (3.14) och späd till 1 l.

3.19. Amberlit XAD-2 hartsberedning.

Tvätta en passande mängd amberlit (3.2) med vatten tills alla klorjoner har försvunnit, vilket framgår vid kontroll med silvernitrat (3.20) utförd på det borthällda vattenskiktet. Tvätta därefter hartsen med 50 ml metanol (3.8). Häll bort metanolet och lagra hartsen under färskt metanol.

3.20. Silvernitratlösning, ca. 0,1 mol/l.

Lös upp 0,17 g silvernitrat (3.9) i 10 ml vatten.

3.21. HPLC mobil fas

Blanda 500 ml acetonitril (3.1) med 300 ml ammoniumacetatbuffertlösning (3.18) och 1 200 ml vatten (3.14). Justera pH-värdet till 4,3 genom att tillsätta ättiksyra (3.5). Filtrera lösningen genom ett 0,22 µm filter (4.8) och lufta den (t. ex. med ultraljud i 10 minuter). Om lösningen förvaras mörkt i en tillsluten behållare är den stabil i en månad.

4. **Utrustning**

4.1. Ultraljudsbad.

4.2. Rotationsindunstare.

4.3. Centrifug.

4.4. HPLC-utrustning med UV detektor med varierbar våglängd eller diodsystemdetektor.

4.4.1. HPLC-kolonn, 300 mm x 4 mm, C 18, 10µm packning eller en motsvarande kolonn.

4.5. Glaskolonn (300 mm x 10 mm) med sintrat glasfilter och avstängningsventil.

4.6. Glasfiberfilter, diameter 150 mm.

4.7. Membranfilter, 0,45 µm

4.8. Membranfilter, 0,22 µm

5. **Utförande**

OBS! Halofuginon som den fria basen är instabil i alkaliska lösningar och etylacetatlösningar. Bör inte stå i etylacetat i mer än 30 minuter.

5.1. Allmänt

5.1.1. Analysera ett blankprov för att kontrollera att varken halofuginon eller andra störande ämnen finns närvarande.

5.1.2. Kontrollera utvinningen genom att analysera blankprovet. Tillsätt den mängd halofuginon som motsvarar den som finns i provet. För att tillsätta 3 mg/kg tillsätts 300 µl av basstandardlösningen (3.6.1) till 10 g av blankprovet. Blanda och vänta i tio minuter innan extraktionen fortsätter (5.2).

OBS! Vid denna metod bör blankprovet vara av samma typ som analysprovet. Vid analys bör halofuginon inte kunna spåras.

5.2. Extraktion

Väg upp 10 gram av det preparerade provet med högst 0,01 g avvikelse i ett 200 ml centrifugrör. Tillsätt 0,5 g natriumaskorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) och 20 ml vatten och blanda. Placera röret i ett vattenbad (80 °C) i 5 minuter. Låt svalna till rumstemperatur. Tillsätt därefter 20 ml natriumkarbonatlösning (3.15) och blanda. Tillsätt omedelbart därefter 100 ml etylacetat (3.4) och skaka röret kraftigt med handen i 15 sekunder. Placera röret i ultraljudsbadet (4.1) i tre minuter och lossa proppen. Centrifugera i två minuter och häll sedan över etylacetatskiktet genom ett glasfiberfilter (4.6) till en 500 ml separeringstratt. Upprepa extraktionen av provet med en ny mängd 100 ml etylacetat. Tvätta de kombinerade extrakterna i en minut med 50 ml saltmättad natriumkarbonatlösning (3.16). Häll bort vattenskiktet.

Extrahera det organiska skiktet i en minut med 50 ml saltsyra (3.17). Det nedersta syraskiktet tappas av i en 250 ml separeringstratt. Extrahera det organiska skiktet en gång till i 1,5 minuter med ytterligare 50 ml saltsyra och blanda med det första extraktet. Tvätta de kombinerade syraextrakten genom att skaka i ca. 10 sekunder med 10 ml etylacetat (3.4).

Överför vattenskiktet kvantitativt till en 250 ml rundbottnad kolv och häll bort det organiska skiktet. Indunsta all resterande etylacetat från syralösningen med en rotationsindunstare (4.2). Vattenbadets temperatur bör inte överskrida 40 °C. Vid ett vakuum på ca. 25 mbar indunstar all resterande etylacetat inom fem minuter vid 38 °C.

5.3. Rening

5.3.1. Beredning av amberlitkolonnen

Bered en XAD-2-kolonn för varje provextrakt. För över 10 g behandlat amberlit (3.19) till en glaskolonn (4.5) med metanol (3.8). Sätt en liten plugg av glasull i toppen av hartskolonnen. Avvattna metanolet från kolonnen och tvätta hartset med 100 ml vatten. Stoppa flödet när vätskan når toppen av hartskolonnen. Låt kolonnen stå i tio minuter för att komma i jämvikt innan användning. Se till att kolonnen aldrig torkar ut.

5.3.2. Rening av proven

För över extraktet (5.2) kvantitativt till den beredda amberlitkolonnen (5.3.1) och eluera. Häll bort eluatet. Flödeshastigheten vid elueringen bör inte överskrida 20 ml/minut. Skölj den rundbottnade kolven med 20 ml saltsyra (3.17) som därefter används för att tvätta hartskolonnen. Avlägsna eventuellt resterade syralösning med luft. Häll bort sköljresterna. Tillsätt 100 ml metanol (3.8) i kolonnen och eluera 5-10 ml. Samla eluatet i en 250 ml rundbottnad kolv. Låt det resterande metanolet stå i tio minuter för att komma i jämvikt med hartset. Fortsätt elueringen med en flödeshastighet som inte får överskrida 20 ml/minut. Samla eluatet i samma rundbottnade kolv. Indunsta metanolen i rotationsindunstaren (4.2). Vattenbadets temperatur bör inte överskrida 40 °C. Överför återstoden kvantitativt till en 10 ml mätkolv genom att använda den mobila fasen (3.21). Häll i mobil fas upp till märket och blanda. Filtrera en uppmätt del genom ett membranfilter (4.7). Reservera denna lösning för HPLC-bestämning (5.4).

5.4. HPLC-bestämning

5.4.1. Parametrar

Följande betingelser är vägledande. Andra betingelser kan användas såvida de ger samma resultat.

HPLC-kolonn (4.4.1).

HPLC mobil fas (3.21).

Flödeshastighet: 1,5 – 2 ml/minut.

Våglengd: 243 nm

Injektionsvolym: 40 – 100 µl.

Kontrollera det kromatografiska systemets stabilitet genom att upprepade gånger injicera kalibreringslösningen (3.6.2) med 3,0 µg/ml, tills konstanta topphöjder (eller arealer) och utvinningsstider uppnåtts.

5.4.2. Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (3.6.2) flera gånger och mät topphöjderna (arealerna) för varje koncentration. Upprätta en kalibreringskurva genom att använda kalibreringslösningarnas medeltopphöjder eller medeltopparealer som ordinata och motsvarande koncentrationerna i µg/ml som abskissa.

5.4.3. Provlösning

Injicera provextraktet (5.3.2) flera gånger genom att använda samma mängd som utnyttjades till kalibreringslösningarna, och bestäm halofuginontopparnas medeltopphöjd (areal).

6. **Resultatberäkning**

Beräkna med hjälp av kalibreringskurvan koncentrationen av provlösningen (5.4.2) i µg/ml, från medelhöjden (arealen) av halofuginontopparna i provlösningen.

Provets halofuginonhalt w (mg/kg) erhålls med formeln:

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

där:

— c: provlösningens halofuginonkoncentration i µg/ml

— m: provmängdens massa i g.

7. **Utvärdering av resultat**

7.1. Identitet

Bekräfta analytets identitet med ko-kromatografi, eller genom detektion med ett diodsystem med vilket provextraktets och kalibreringslösningens (3.6.2) spektrum innehållande 6,0 µg/ml jämförs.

7.1.1. Ko-kromatografi

Förstärk ett provextrakt genom att tillsätta en passande mängd kalibreringslösning (3.6.2). Den tillsatta mängden halofuginon skall vara den samma som den uppskattade mängden halofuginon som har påträffats i provextraktet.

Endast höjden av halofuginontoppen får ökas efter det att hänsyn tagits till både den tillsatta mängden och förtunningen av extraktet. Toppens bredd skall, vid den halva höjden, ligga inom ± 10 % av originalbredden.

7.1.2. Detektion med diodsystem

Resultaten utvärderas enligt nedanstående kriterier:

a) Provens och standardspektrumets maximala absorptionsvåglängd, uppmätt vid toppens spets på kromatgrammet, måste vara den samma innanför en marginal som är avhängig detektorsystemets upplösningsstyrka. För detektion med diodsystem är den typiskt ± 2 nm.

b) Mellan 225 och 300 nm får prov- och standardspektrumet, uppmätt i toppens spets på kromatogrammet, inte vara olika för de delar av spektrumet som ligger inom 10 — 100 % relativ absorption. Detta kriterium anses uppfyllt om samma maxima är närvarande och avvikelsen mellan två spektrum på ingen observerad punkt överstiger 15 % av standardanalytets absorption.

c) Mellan 225 och 300 nm får spektrumet på inget ställe av provextraktets topp skilja sig från varandra för de delar av spektrumet som ligger inom 10 — 100 % relativ absorption. Detta kriterium anses uppfyllt om samma maxima är närvarande och avvikelsen mellan spektrumen på ingen observerad punkt överstiger 15 % av spektrumets absorption i toppen.

Om ett av dessa kriterier inte uppfylls anses analytets närvaro inte bekräftat.

7.2. Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten av två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte överstiga 0,5 mg/kg för halofuginonhalter till och med 3 mg/kg.

7.3. Utvinning

Utvinningen av det förstärkta blankprovet bör vara minst 80 %.

8. **Resultat av en samarbetsanalys**

Vid en samarbetsanalys(1) analyserades tre prover av åtta laboratorier.

Resultat

	Prov A (blankt) vid mottagande	Prov B (mjöl)		Prov C (pellets)	
		vid mottagande	efter 2 månader	vid mottagande	efter 2 månader
Medel(1)	i. p.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
utv.		86	74	88	75

(1): enheter i mg/kg.
i. p.: inte påvisat.
S_R: standardavvikelse för reproducerbarhet.
CV_R: variationskoefficient (%).
utv.: utvinning (%).

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