II

*(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)*

# COMMISSIE

## ELFDE RICHTLIJN 93/70/EEG VAN DE COMMISSIE

**van 28 juli 1993**

**tot vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders**

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van 20 juli 1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (1), laatstelijk gewijzigd bij Verordening 3768/85 (2), en met name op artikel 2,

Overwegende dat in Richtlijn 70/373/EEG is bepaald dat de officiële controle van diervoerders die tot doel heeft na te gaan of aan de op grond van de wettelijke of bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van diervoeders gestelde eisen is voldaan, volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden dient te worden verricht;

Overwegende dat, om te controleren of de voorwaarden inzake het gebruik van halofuginon in diervoeders worden nageleefd, op communautair niveau een analysemethode voor dit additief moet worden vastgesteld;

Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor diervoeders,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

*Artikel 1*

De Lid-Staten schrijven voor dat de analyses voor de officiële controle van diervoeders ten aanzien van het gehalte aan halofuginon worden uitgevoerd volgens de in de bijlage omschreven methode.

*Artikel 2*

De Lid-Staten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om uiterlijk op 30 juni 1994 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de Lid-Staten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de Lid-Staten.

*Artikel 3*

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 28 juli 1993.

*Voor de Commissie*
René STEICHEN
*Lid van de Commissie*

(1) PB nr. L 170 van 3. 8. 1970, blz. 2.
(2) PB nr. L 362 van 31. 12. 1985, blz. 8.

*BIJLAGE*

## BEPALING VAN HALOFUGINON

4(3H)chinazolinon-7-broom-6-chloor-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-dl-trans-hydrobromide

### 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van halofuginon in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 1 mg/kg.

### 2. Principe

Na behandeling met heet water wordt halofuginon als vrije base in ethylacetaat geëxtraheerd en vervolgens als hydrochloride in zure oplossing geëxtraheerd. Het extract wordt gezuiverd door middel van ionenwisselingschromatografie. Het gehalte aan halofuginon wordt bepaald met reversed phase hoge-druk-vloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

### 3. Reagentia

3.1. Acetonitril, HPLC-kwaliteit

3.2. Amberlite XAD-2 hars

3.3. Ammoniumacetaat

3.4. Ethylacetaat

3.5. Azijnzuur

3.6. Halofuginon standaardstof
(4(3H)chinazolinon-7-broom-6-chloor-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-dl-trans-hydrobromide, E 764)

3.6.1. Voorraadoplossing halofuginon, 400 µg/ml

Weeg 50 mg halofuginon (3.6) op 0,1 mg nauwkeurig in een maatkolf van 500 ml, los op in ammoniumacetaat-bufferoplossing (3.18), vul aan tot de maatstreep met bufferoplossing en meng. Deze oplossing is bij 5 °C in het donker drie weken houdbaar.

3.6.2. IJkoplossingen.

Breng in een reeks maatkolven van 100 ml respectievelijk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 6,0 ml voorraadoplossing (3.6.1). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.21) en meng. Deze oplossingen hebben concentraties van respectievelijk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 6,0 µg/ml halofuginon. Bereid deze oplossingen vers vóór gebruik.

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

3.8. Methanol

3.9. Zilvernitraat

3.10. Natriumascorbaat

3.11. Natriumcarbonaat

3.12. Natriumchloride

3.13. EDTA (ethyleendiamine-tetraazijnzuur, dinatriumzout)

3.14. Water, HPLC-kwaliteit

3.15. Natriumcarbonaatoplossing, $\theta$ = 10 g/100 ml

3.16. Met natriumchloride verzadigde natriumcarbonaatoplossing, $\theta$ = 5 g/100 ml

Los 50 g natriumcarbonaat (3.11) op in water, vul aan tot 1 l en voeg natriumchloride (3.12) toe tot de oplossing verzadigd is.

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

Vul 10 ml zoutzuur (3.7) aan met water tot 1 l.

3.18. Bufferoplossing ammoniumacetaat, ca. 0,25 mol/l

Los 19,3 g ammoniumacetaat (3.3) en 30 ml azijnzuur (3.5) op in water (3.14) en vul aan tot 1 l.

3.19. Bereiding Amberlite XAD-2-hars

Was een geschikte hoeveelheid Amberlite (3.2) met water tot alle chloride-ionen zijn verwijderd, zoals vastgesteld met een zilvernitraatproef (3.20) op het waswater. Was de hars daarna met 50 ml methanol (3.8), verwerp de methanol en bewaar de hars onder verse methanol.

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

Los 0,17 g zilvernitraat (3.9) op in 10 ml water.

3.21. Mobiele fase HPLC

Meng 500 ml acetonitril (3.1) met 300 ml ammoniumacetaat-buffer (3.18) en 1 200 ml water (3.14). Breng de pH met azijnzuur (3.5) op 4,3. Filtreer door een filter van 0,22 µm (4.8) en ontgas de oplossing (bij voorbeeld door 10 minuten ultrasoonbehandeling). De oplossing is in afgesloten toestand in het donker één maand houdbaar.

## 4. Apparatuur

4.1. Ultrasoonbad

4.2. Rotatievacuümverdamper

4.3. Centrifuge

4.4. HPLC-apparatuur met UV-detector met variabele golflengte of diode array detector

4.4.1. Vloeistofchromatografiekolom, 300 mm × 4 mm, C-18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom

4.5. Glazen kolom (300 mm × 10 mm) voorzien van een gesinteerd glazen filter en een stop

4.6. Glasvezelfiters, doorsnede 150 mm

4.7. Membraanfilters, 0,45 µm

4.8. Meembraanfilters, 0,22 µm

## 5. Werkwijze

*Opmerking:* halofuginon als vrije base is in basisch milieu en in ethylacetaat niet stabiel. Het mag niet langer dan 30 minuten in ethylacetaat blijven.

5.1. Algemeen

5.1.1. Een blanco diervoeder dient geanalyseerd te worden om te controleren dat noch halofuginon, noch storende stoffen aanwezig zijn.

5.1.2. De recovery dient bepaald te worden door middel van analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid halofuginon is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 3 mg/kg wordt 300 µl voorraadoplossing (3.6.1) aan 10 g blanco diervoeder toegevoegd. Vervolgens wordt gemengd en 10 minuten gewacht alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

*Opmerking:* voor het doel van deze methode dient het blanco diervoeder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin bij analyse geen halofuginon detecteerbaar te zijn.

5.2. Extractie

Weeg af 10 g van het voorbereide monster op 0,01 g nauwkeurig in een centrifugebuis van 200 ml, voeg 0,5 g natriumascorbaat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) en 20 ml water toe en meng. Plaats de buis 5 minuten in een waterbad van 80 °C. Voeg na afkoelen tot kamertemperatuur 20 ml natriumcarbonaatoplossing (3.15) toe en meng. Voeg direct daarna 100 ml ethylacetaat (3.4) toe en schud 15 seconden krachtig met de hand. Plaats daarna de buis, met niet geheel afgesloten stop, 3 minuten in een ultrasoonbad (4.1). Centrifugeer 2 minuten en decanteer daarna het ethylacetaat door een glasvezelfilter (4.6) in een scheitrechter van 500 ml. Herhaal de extractie van het monster met een tweede portie van 100 ml ethylacetaat. Was de verzamelde extracten 1 minuut met 50 ml met natriumchloride verzadigde natriumcarbonaatoplossing (3.16) en verwerp de waterlaag. Extraheer de organische laag 1 minuut met 50 ml zoutzuur (3.17). Breng de onderstaande waterige fase over in een scheitrechter van 250 ml. Extraheer de organische laag 1,5 minuut lang met nog eens 50 ml zoutzuur en voeg dit bij het eerste extract. Was de verzamelde zuurextracten door ongeveer 10 seconden zwenken met 10 ml ethylacetaat (3.4).

Breng de waterige fase kwantitatief over in een rondbodemkolf van 250 ml en verwerp de organische fase. Verwijder met een rotatievacuümverdamper (4.2) alle overblijvende ethylacetaat uit de oplossing. De temperatuur van het waterbad mag niet hoger dan 40 °C zijn. Bij een verminderde druk van ca. 25 mbar is alle ethylacetaat bij 38 °C in 5 minuten verwijderd.

5.3. Opwerking

5.3.1. Bereiding van de Amberlite-kolom

Voor elk monsterextract wordt een XAD-2-kolom bereid. Breng 10 g bereide Amberlite (3.19) met methanol in een glazen kolom (4.5). Breng een propje glaswol bovenop het harsbed. Laat de methanol uit de kolom lopen en was de hars met 100 ml water, waarbij het vloeistofniveau boven het harsbed moet blijven. Laat de kolom voor gebruik 10 minuten equilibreren. Zorg er voor dat de kolom nooit droog komt te staan.

5.3.2. Zuivering monsterextract

Breng het extract (5.2) kwantitatief over op de top van de bereide Amberlite-kolom (5.3.1) en elueer de kolom, waarbij het eluaat wordt verworpen. De elutiesnelheid mag niet meer dan 20 ml/min. bedragen. Spoel de rondbodemkolf met 20 ml zoutzuur (3.17) en gebruik de spoelvloeistof om de harskolom te spoelen. Blaas eventuele resten zuuroplossing door met een stroom lucht. Verwerp de spoelvloeistof. Breng 100 ml methanol (3.8) op de kolom, laat 5-10 ml elueren en vang het eluaat op in een rondbodemkolf van 250 ml. Laat de rest van de methanol 10 min met de hars equilibreren, vervolg de elutie met een snelheid van niet meer dan 20 ml/min. en vang het eluaat op in dezelfde rondbodemkolf. Damp de methanol in met behulp van de rotatievacuümverdamper (4.2), waarbij de temperatuur van het waterbad niet boven 40 °C mag komen. Beng het residu met de mobiele fase (3.21) kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml. Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase en meng. Een deel wordt door een membraanfilter (4.7) gefiltreerd. Gebruik deze oplossing voor de HPLC-bepaling (5.4).

5.4. HPLC-bepaling

5.4.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad aangegeven, andere parameters mogen gebruikt worden onder voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

Vloeistofchromatografiekolom (4.4.1)

Mobile fase HPLC (3.21)

Elutiesnelheid : 1,5 tot 2 ml/min

Detectiegolflengte : 243 nm

Injectievolume : 40 tot 100 µl

Controleer de stabiliteit van het chromatografisch system door enige malen de ijkoplossing (3.6.2) met 3,0 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten (-oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.4.2. IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.6.2) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogten (-oppervlakten). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.4.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.3.2) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt, en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de halofuginonpieken.

6. **Berekening van de resultaten**

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (-oppervlakte) van de halofuginonpieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.4.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan halofuginon w (mg/kg) wordt verkregen met behulp van de volgende formule :

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

waarin :

— c : concentratie halofuginon van de monsteroplossing in µg/ml

— m : massa van de analyseportie in g.

7. **Validatie van de resultaten**

7.1. De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door cochromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract en de ijkoplossing (3.6.2) met 6,0 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.6.2) toe. De toegevoegde hoeveelheid halofuginon moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid halofuginon in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de halofuginonpiek mag naar verhouding toenemen, rekening houdend met de toegevoegde hoeveelheid en met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale hoogte moet binnen ± 10 % van de oorspronkelijke breedte liggen.

7.1.2. Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld :

a) De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesyteem. Voor diode array detectie is deze marge meestal ± 2 nm.

b) Tussen 225 en 300 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorpie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de twee spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van de standaard bedraagt.

c) Tussen 225 en 300 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100 % niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag bij halofuginongehalten tot maximaal 3 mg/kg niet meer dan 0,5 mg/kg bedragen.

7.3. Recovery

Voor het blanco-monster met toevoeging (5.1) dient het terugvindingspercentage ten minste 80 % te bedragen.

8. **Resultaten van een ringonderzoek**

In een ringonderzoek (1) werden drie monsters door acht laboratoria onderzocht.

**Resultaten**

| | Monster A (blanco-voeder) na ontvangst | Monster B (meel) | | Monster C (pellets) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | na ontvangst | na 2 maanden | na ontvangst | na 2 maanden |
| gemiddeld (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): eenheden in mg/kg.
n.d.: niet detecteerbaar.
$S_R$: standaardafwijking van de reproduceerbaarheid.
$CV_R$: variatiecoëfficiënt (%).
rec.: recovery (%).

(1) *The Analyst* 108, 1983, pp. 1252-1256.