II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS ELVTE DIREKTIV 93/70/EØF

af 28. juli 1993

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til den officielle kontrol med foderstoffer

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer (1), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 3768/85 (2), særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

Ved dirketiv 70/373/EØF er det fastsat, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat på grundlag af administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser om foderstoffernes beskaffenhed og sammensætning, er opfyldt, foretages efter fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder;

for at det kan kontrolleres, om betingelserne for at anvende halofuginon i foderstoffer overholdes, bør der fastsættes en fællesskabsanalysemetode for dette tilsætningsstof;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af foderstoffer, for så vidt angår deres indhold af halofuginon, skal foretages efter den metode, der er beskrevet i bilaget.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter senest den 30. juni 1994 de nødvendige administrativt eller ved lov fastsatte bestemmelser i kraft for at efterkomme bestemmelserne i dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Når medlemsstaterne vedtager disse bestemmelser, henvises der deri til dette direktiv, eller de ledsages ved offentliggørelsen af en sådan henvisning. De nærmere regler for denne henvisning fastsættes af medlemsstaterne.

Artikel 3

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 28. juli 1993.

På Kommissionens vegne

René STEICHEN

Medlem af Kommissionen

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

BILAG

BESTEMMELSE AF HALOFUGINON

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

1. **Formål og anvendelsesområde**

Dette er en metode til bestemmelse af halofuginon i foderstoffer. Den nedre bestemmelsesgrænse er 1 mg/kg.

2. **Princip**

Efter behandling med varmt vand ekstraheres halofuginon som fri base med etylacetat og separeres derefter som hydroklorid over i en vandig syreopløsning. Ekstraktet oprenses ved ionbytningskromatografi. Indholdet af halofuginon bestemmes ved omvendt-fase HPLC ved brug af en UV-detektor.

3. **Reagenser**

3.1. Acetonitril, HPLC-kvalitet

3.2. Amberlit XAD-2 resin

3.3. Ammoniumacetat

3.4. Etylacetat

3.5. Eddikesyre

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

3.6.1. Halofuginon standardopløsning, 100 µg/ml

50 mg halofuginon (3.6) afvejes til det nærmeste 0,1 mg i en 500 ml målekolbe, opløses i ammoniumacetatbufferopløsning (3.18), fyldes op med bufferopløsning til mærket og blandes. Denne opløsning er stabil i tre uger ved 5 °C ved opbevaring i mørke.

3.6.2. Kalibreringsopløsninger

1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 ml af standardopløsningen (3.6.1) overføres til en række 100 ml målekolber. Der fyldes op til mærket med mobil fase (3.21) og blandes. Disse opløsninger har koncentrationer på henholdsvis 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 og 6,0 µg/ml halofuginon. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart før brug.

3.7. Saltsyre (ρ_{20} ca. 1,16 g/ml)

3.8. Metanol

3.9. Sølvnitrat

3.10. Natriumascorbat

3.11. Natriumkarbonat

3.12. Natriumklorid

3.13. EDTA (etylendiamintetraeddikesyre, dinatriumsalt)

3.14. Vand, HPLC-kvalitet

3.15. Natriumkarbonatopløsning, 6 = 10 g/100 ml

3.16. Saltmættet natriumkarbonatopløsning, 6 = 5 g/100 ml

50 g natriumkarbonat (3.11) opløses i vand og fortyndes til 1 l, hvorefter der tilsættes salt (3.12), indtil opløsningen er mættet.

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

10 ml HCI (3.7) fortyndes med vand til 1 l.

3.18. Ammoniumacetatbufferopløsning, ca. 0.25 mol/l

19,3 g ammoniumacetat (3.3) og 30 ml eddikesyre (3.5) opløses i vand (3.14) og fortyndes til 1 l.

3.19. Amberlit XAD-2 resinforberedelse

En passende mængde amberlit (3.2) vaskes med vand, til alle kloridioner er fjernet, således som det viser sig ved kontrol med sølvnitrat (3.20) på den kasserede, vandige fase. Resinen vaskes derefter med 50 ml metanol (3.8), methanolen kasseres, og resinen opbevares under metanol.

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

0,17 g sølvnitrat (3.9) opløses i 10 ml vand.

3.21. HPLC mobil fase

500 ml acetonitril (3.1) blandes med 300 ml ammoniumacetatbufferopløsning (3.18) og 1 200 ml vand (3.14). PH-værdien justeres til 4,3 ved tilsætning af eddikesyre (3.5) Opløsningen filtreres gennem et 0,22 µm filter (4.8) og udluftes (f.eks. med ultralyd i ti minutter). Denne opløsning er stabil i en måned, hvis den opbevares mørkt i en lukket beholder.

4. Apparatur

4.1. Ultralydbad

4.2. Rotationsinddamper

4.3. Centrifuge

4.4. HPLC-udstyr med UV-detektor med variabel bølgelængde- eller diodearraydetektor

4.4.1. HPLC-kolonne, 300 mm × 4 mm, C 18, 10 µm pakning eller en tilsvarende kolonne

4.5. Glassøjle (300 mm × 10 mm) med filter af sintret glas og stophane

4.6. Glasfiberfiltre, diameter 150 mm

4.7. Membranfilter, 0,45 µm

4.8. Membranfilter 0,22 µm

5. Fremgangsmåde

NB: Halofuginon er som fri base ustabil i alkaliske opløsninger og etylacetatopløsninger. Bør ikke henstå i etylacetat i over 30 minutter.

5.1. Generelt

5.1.1. En blindprøve analyseres for at kontrollere, at der hverken er halofuginon eller andre interfererende stoffer til stede.

5.1.2. Genfindelsen kontrolleres ved at analysere blindprøven, der tilsættes halofuginon i en mængde svarende til analyseprøvens indhold. For at tilsætte 3 mg/kg tilsættes 300 µl af stamopløsningen (3.6.1) til 10 g blindprøve. Bland og vent ti minutter, før der fortsættes med ekstraktion (5.2).

Fodnote: Til denne metode anvendes en blindprøve af samme type som analyseprøven, og som ved analyse viser sig ikke at indeholde halofuginon.

5.2. Ekstraktion

10 g af den tilberedte prøve afvejes til nærmeste 0,01 g i et 200 ml centrifugeglas, der tilsættes 0,5 g natriumascorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) og 20 ml vand, hvorefter der blandes. Anbring centrifugeglasset i et vandbad (80° C) i 5 min. Efter afkøling til stuetemperatur tilsæt 210 ml natriumcarbonatopløsning (3.15) og bland. Tilsæt straks 100 ml etylacetat (3.4) og ryst glasset kraftigt i hånden i 15 sekunder. Derefter anbringes glasset i tre minutter i ultralydbadet (4.1), og proppen løsnes. Der centrifugeres i to minutter, og etylacetatfasen hældes gennem et glasfiberfilter (4.6) over i en 500 ml skilletragt. Ekstraktionen af prøven gentages med en ny portion på 100 ml etylacetat. De kombinerede ekstrakter vaskes i et minut med 50 ml saltmættet natriumkarbonatopløsning (3.16), og den vandige fase kasseres.

Den organiske fase ekstraheres et minut med 50 ml saltsyre (3.17) Den nederste syrefase aftappes i en 250 ml skilletragt. Den organiske fase ekstraheres igen i 1,5 minutter med yderligere 50 ml saltsyre og blandes med det første ekstrakt. De kombinerede syreekstrakter vaskes ved at omryste ca. ti sekunder med 10 ml etylacetat (3.4).

Den vandige fase overføres kvantitativt til en 250 ml rundbundet kolbe, og den organiske fase kasseres. Al den resterende etylacetat fordampes fra syreopløsningen ved brug af en rotationsfordamper (4.2). Vandbadets temperatur bør ikke være over 40° C. Under et vakuum på ca. 25 mbar vil al den resterende etylacetat blive fjernet i løbet af fem minutter ved 38° C.

5.3. Oprensning

5.3.1. Tilberedning af amberlitsøjlen

Der tilberedes en XAD-2-søjle for hver prøveekstrakt. 10 g behandlet amberlit (3.19) overføres med metanol (3.8) til en glaskolonne (4.5). Der puttes en tot glasuld på toppen af resinsøjlen. Metanolen aftappes fra søjlen, og resinen vaskes med 100 ml vand, idet der standses, når væsken når toppen af resinsøjlen. Søjlen henstår for at komme i ligevægt i ti minutter inden brug. Man må aldrig lade søjlen løbe tør.

5.3.2. Opresning af prøven

Ekstraktet (5.2) overføres kvantitativt til den tilberedte amberlitsøjle (5.3.1), og der elueres; eluatet kasseres. Elueringshastigheden bør ikke være over 20 ml/minut. Den rundbundede kolbe skylles med 20 ml saltsyre (3.17), som derefter benyttes til at rense resinsøjlen. Eventuelt resterende syreopløsning fjernes med luft. Rensevæskerne kasseres. 100 ml metanol (3.8) tilsættes søjlen og 5—10 ml elueres; eluatet opsamles i en 250 ml rundbundet kolbe. Den resterende metanol henstår ti minutter for at komme i ligevægt med resinsøjlen, og elueringen fortsættes ved en hastighed på ikke over 20 ml/minut; eluatet opsamles i samme rundbundede kolbe. Metanolen fordampes på rotationsfordamperen (4.2); vandbadets temperatur bør ikke være over 40° C. Remanensen overføres kvantitativt til en 10 ml målekolbe ved brug af den mobile fase (3.21). Der fyldes op til mærket med mobil fase og blandes. En alikvot mængde filtreres gennem et membranfilter (4.7). Denne opløsning gemmes til HPLC-bestemmelsen (5.4).

5.4. HPLC-bestemmelse

5.4.1. Parametre

Følgende betingelser er vejledende. Andre betingelser kan bruges, såfremt de giver de samme resultater.

HPLC-kolonne (4.4.1)

HPLC mobil fase (3.21)

Flowhastighed: 1,5-2 ml/minut

Detektorbølgelængde: 243 nm

Injektionsvolumen: 40-100 µl

Kromatografsystemets stabilitet kontrolleres ved, at der flere gange injiceres kaliberingsopløsning (3.6.2) med 3,0 µg/ml, indtil der er opnået konstante tophøjder (arealer) og retentionstider.

5.4.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.6.2) injiceres flere gange, og højden af toppene (arealerne) for hver koncentration måles. Der plottes en kalibreringskurve ved brug af kalibreringsopløsningernes middeltophøjder eller -arealer som ordinater og de tilsvarende koncentrationer i mg/ml som abscisser.

5.4.3. Prøveopløsning

Prøveekstraktet (5.3.2) injiceres flere gange, idet der benyttes samme mængde som til kalibreringsopløsningerne, og middeltophøjden (arealet) af halofuginontoppene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra middeltophøjden (arealet) af prøveopløsningens halofuginontoppe bestemmes prøveopløsningens koncentration i µg/ml ved benyttelse af kalibreringskurven (5.4.2).

Prøvens indhold af halofuginon w (mg/kg) beregnes efter følgende formel:

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

hvor:

— c: prøveopløsningens halofuginonkoncentration i µg/ml

— m: prøveportionens masse i g.

7. Evaluering af resultaterne

7.1. Identitet

Stoffets identitet kan bekræftes ved co-kromatografi eller ved at benytte en diodearraydetektor, hvorved prøveekstraktets og kalibreringsopløsningens (3.6.2) spektre indeholdende 6,0 µg/ml sammenlignes.

7.1.1. Co-kromatografi

Et prøveekstrakt adderes ved tilsætning af en passende mængde kalibreringsopløsning (3.6.2). Den tilsatte mængde halofuginon skal være af samme størrelse som den skønnede mængde halofuginon, der er fundet i prøveekstraktet.

Kun højden af halufuginontoppen må øges, efter at der er taget hensyn til både den tilsatte mængde og fortyndingen af ekstraktet. Toppens bredde skal, ved den halve højde, ligge inden for ± 10 % af den oprindelige bredde.

7.1.2. Diodearraydetektion

Resultaterne evalueres efter nedenstående kriterier:

a) Den maksimale absorbtionsbølgelængde af prøvens og standardens spektre, målt ved toppens spids på kromatogrammet, skal være den samme inden for en margen, der afhænger af detektorsystemets opløsningsevne. Ved dioderarraydetektion er den typisk ± 2 nm.

b) Mellem 225 og 300 nm må prøvens og standardtoppens spektre, målt i toppens spids på kromatogrammet, ikke være forskellige for de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorption. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem to spektre på intet observeret punkt overstiger 15 % af standardstoffet.

c) Mellem 225 og 300 nm må spektrene intet sted på prøveekstraktets top være forskellige fra hinanden i de dele af spektret, der ligger inden for 10-100 % relativ absorption. Dette kriterium er opfyldt, hvis de samme maksima er til stede, og afvigelsen mellem spektrene på intet observeret punkt overstiger 15 % af spektrets absorption i spidsen.

Hvis et af disse kriterier ikke er opfyldt, er stoffets tilstedeværelse ikke bekræftet.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser foretaget på samme prøve må ikke være på over 0,5 mg/kg for halofuginonindhold op til 3 mg/kg.

7.3. Genfindelse

Genfindelsen for den tilsatte blindprøve bør være mindst 80 %.

8. Resultaterne af en ringanalyse

Der blev arrangeret en ringanalyse (1), hvorved tre prøver blev analyseret af otte laboratorier.

Resultater

	Prøve A (blind) ved modtagelse	Prøve B (mel)		Prøve C (piller)	
		ved modtagelse	efter 2 måneder	ved modtagelse	efter 2 måneder
Middel (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
genf.		86	74	88	75

(1): enheder i mg/kg.
i.p.: ikke påvist.
S_R: standardafvigelse for reproducerbarhed.
CV_R: variationskoefficient (%).
genf: genfinding (%).

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