

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

ELFTE RICHTLINIE 93/70/EWG DER KOMMISSION

vom 28. Juli 1993

zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 3768/85⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß der Richtlinie 70/373/EWG werden die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Feststellung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen an Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt.

Zur Kontrolle der Einhaltung der Bedingungen, die bei der Verwendung von Halofuginon in der Tierfütterung einzuhalten sind, sollte eine gemeinschaftliche Analyse-methode festgelegt werden.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln auf ihren Gehalt an Halofuginon nach der im Anhang zu dieser Richtlinie beschriebenen Methode durchgeführt werden.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie spätestens am 30. Juni 1994 nachzukommen. Sie setzen die Kommission hiervon in Kenntnis.

Wenn die Mitgliedstaaten die Vorschriften nach Absatz 1 erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

Artikel 3

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 28. Juli 1993

Für die Kommission

René STEICHEN

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 362 vom 31. 12. 1985, S. 8.

ANHANG

BESTIMMUNG VON HALOFUGINON

DL-Trans-7-Brom-6-Chlor-3-[3-(3-Hydroxy-2-Piperidyl) Acetyl]-4(3H)-Chinazolin-Hydrobromid

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Methode dient der Bestimmung von Halofuginon in Futtermitteln. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 1 mg/kg.

2. Prinzip

Nach der Behandlung mit heißem Wasser wird Halofuginon als freie Base mit Ethylacetat extrahiert und anschließend durch Ausschütteln mit Salzsäure in das Hydrochlorid überführt. Die saure Lösung wird durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Der Behalt an Halofuginon wird mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) unter Verwendung eines UV-Detektors bestimmt.

3. Reagenzien

3.1. Acetonitril für die HPLC

3.2. Amberlite XAD-2-Harz

3.3. Ammoniumacetat

3.4. Ethylacetat

3.5. Essigsäure

3.6. Halofuginon-Standardsubstanz : (DL-Trans-7-Brom-6-Chlor-3-[3-(3-Hydroxy-2-Piperidyl) Acetyl]-4(3H)-Chinazolin-Hydrobromid(E 764)

3.6.1. Halofuginon-Standard-Stammlösung, 100 µg/ml

50 mg Halofuginon (3.6) werden auf 0,1 mg genau in einen 500-ml-Meßkolben eingewogen und in Ammoniumacetat-Pufferlösung (3.18) gelöst. Es wird mit der Pufferlösung zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung ist drei Wochen haltbar, wenn sie im Dunkeln bei 5 °C aufbewahrt wird.

3.6.2. Eichlösungen

Von der Standard-Stammlösung (3.6.1) werden 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 6,0 ml jeweils in einen 100-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase (3.21) bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösungen enthalten Halofuginon in Konzentrationen von 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 und 6,0 µg/ml. Die Lösungen sind vor Gebrauch frisch herzustellen.

3.7. Salzsäure, ρ_{20} ca 1,16 g/ml

3.8. Methanol

3.9. Silbernitrat

3.10. Natriumascorbat

3.11. Natriumcarbonat

3.12. Natriumchlorid

3.13. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz)

3.14. Wasser für die HPLC

3.15. Natriumcarbonatlösung, $\phi = 10$ g/100 ml

3.16. Mit Natriumchlorid gesättigte Natriumcarbonatlösung, $\phi = 5$ g/100 ml

50 g Natriumcarbonat (3.11) werden in Wasser gelöst und auf 1 l verdünnt; dann wird Natriumchlorid (3.12) zugegeben, bis die Lösung gesättigt ist.

3.17. Salzsäure, ca 0,1 mol/l

10 ml Salzsäure (3.7) werden mit Wasser auf 1 l verdünnt.

3.18. Ammoniumacetat-Pufferlösung, ca. 0,25 mol/l

19,3 g Ammoniumacetat (3.3) und 30 ml Essigsäure (3.5) werden in Wasser (3.14) gelöst und auf 1 l verdünnt.

3.19. Vorbereitung des Amberlite XAD-2-Harzes

Eine ausreichende Menge Amberlite (3.2) wird mit Wasser chloridfrei gewaschen. Die Prüfung der Waschflüssigkeit erfolgt mit Silbernitratlösung (3.20). Danach wird das Harz mit 50 ml Methanol (3.8) gewaschen. Das Methanol wird verworfen und das Harz in frischem Methanol aufbewahrt.

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

0,17 g Silbernitrat (3.9) werden in 10 ml Wasser gelöst.

3.21. Mobile Phase für die HPLC

500 ml Acetonitril (3.1) werden mit 300 ml Ammoniumacetat-Pufferlösung (3.18) und 1 200 ml Wasser (3.14) gemischt. Der pH-Wert wird mit Essigsäure (3.5) auf 4,3 eingestellt. Die Lösung wird durch ein 0,22- μ m-Filter (4.8) filtriert und entgast (z. B. durch zehnmünütige Ultraschallbehandlung). Diese Lösung ist einen Monat lang haltbar, wenn sie in einem verschlossenen Gefäß im Dunkeln aufbewahrt wird.

4. Geräte**4.1. Ultraschallbad****4.2. Rotationsverdampfer****4.3. Zentrifuge****4.4. HPLC-Einrichtung mit UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung oder Diodenarray-Detektor****4.4.1. Trennsäule, 300 mm \times 4 mm, C₁₈-Füllmaterial, Teilchengröße 10 μ m, oder vergleichbare Säule****4.5. Glassäule (300 mm \times 10 mm), mit gesinterter Glasfilter und Absperrhahn****4.6. Glasfaserfilter, Durchmesser 150 mm****4.7. Membranfilter, 0,45 μ m****4.8. Membranfilter, 0,22 μ m****5. Durchführung**

Anmerkung: Halofuginon ist als freie Base in Alkali- und Ethylacetat-Lösungen instabil. Es sollte in Ethylacetat nicht länger als 30 Minuten bleiben.

5.1. Allgemeines**5.1.1. Eine Blindprobe wird untersucht, um zu prüfen, ob weder Halofuginon noch Störsubstanzen vorhanden sind.**

5.1.2. Die Wiederfindung wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit Halofuginon angereichert wurde. Die zugesetzte Menge an Halofuginon sollte der in der Probe vorhandenen Menge entsprechen. Um auf einen Gehalt von 3 mg/kg anzureichern, werden 300 μ l der Standard-Stammlösung (3.6.1) zu 10 g der Blindprobe gegeben. Es wird gemischt und 10 Minuten gewartet, bevor mit dem Extraktionsschritt (5.2) fortgefahren wird.

Anmerkung: Für den Zweck dieser Methode sollte die Blindprobe ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe, und Halofuginon sollte nicht nachweisbar sein.

5.2. Extraktion

10 g der gemahlten Probe werden auf 0,01 g genau in ein 200-ml-Zentrifugenglas eingewogen. Es werden 0,5 g Natriumascorbat (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) und 20 ml Wasser hinzugefügt, und es wird gemischt. Das Zentrifugenglas wird 5 Minuten in ein 80 °C heißes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 20 ml Natriumcarbonatlösung (3.15) hinzugefügt, und es wird gemischt. Unmittelbar danach werden 100 ml Ethylacetat (3.4) hinzugefügt, und es wird 15 Sekunden kräftig von Hand geschüttelt. Danach wird das Zentrifugenglas mit gelockertem Stopfen 3 Minuten in ein Ultraschallbad (4.1) gestellt. Es wird 2 Minuten zentrifugiert und die Ethylacetatphase durch ein Glasfaserfilter (4.6) in einen 500-ml-Scheidetrichter dekantiert. Die Extraktion der Probe wird mit weiteren 100 ml Ethylacetat wiederholt. Die vereinigten Extrakte werden 1 Minute lang mit 50 ml der mit Natriumchlorid gesättigten Natriumcarbonatlösung (3.16) geschüttelt. Die wäßrige Phase wird verworfen.

Die organische Phase wird 1 Minute mit 50 ml Salzsäure (3.17) extrahiert. Die (untere) Säurephase wird in einen 250-ml-Scheidetrichter abgelassen. Die organische Phase wird erneut 1,5 Minuten mit weiteren 50 ml Salzsäure extrahiert. Die beiden Säureextrakte werden vereinigt und durch ca. 10 Sekunden langes Schütteln mit 10 ml Ethylacetat (3.4) gewaschen.

Die wäßrige Phase wird quantitativ in einen 250-ml-Rundkolben überführt und die organische Phase verworfen. Das restliche in der sauren Lösung enthaltene Ethylacetat wird mit Hilfe des Rotationsverdampfers (4.2) entfernt. Die Badtemperatur sollte 40 °C nicht überschreiten. Bei einem Unterdruck von ca. 25 mbar wird das restliche Ethylacetat bei 38 °C innerhalb von 5 Minuten entfernt.

5.3. Reinigung

5.3.1. Vorbereitung der Amberlitesäule

Für jeden Probenextrakt wird eine XAD-2-Säule vorbereitet. 10 g des vorbereiteten Amberlites (3.19) werden mit Hilfe von Methanol (3.8) in eine Glassäule (4.5) eingefüllt. Auf das obere Ende des Harzbettes wird ein kleiner Glaswattebausch gebracht. Man läßt das Methanol aus der Säule ablaufen und wäscht das Harz mit 100 ml Wasser. Sobald die Flüssigkeit das obere Ende des Harzbettes erreicht hat, wird der Absperrhahn geschlossen. Vor Gebrauch ist die Säule 10 Minuten zu äquilibrieren. Die Säule darf nie trockenlaufen.

5.3.2. Reinigung der Probe

Der Extrakt (5.2) wird quantitativ auf die vorbereitete Amberlitesäule (5.3.1) aufgebracht und eluiert. Das Eluat wird verworfen. Die Elutionsgeschwindigkeit sollte 20 ml/min nicht überschreiten. Der Rundkolben wird mit 20 ml Salzsäure (3.17) gespült und die Austauschersäule mit der Spülflüssigkeit gewaschen. Die auf der Säule verbliebene saure Lösung wird mit einem Luftstrom restlos ausgeblasen. Die Waschlösungen werden verworfen. Es werden 100 ml Methanol (3.8) auf die Säule gegeben und ein Eluat von 5—10 ml in einem 250-ml-Rundkolben aufgefangen. Das restliche Methanol wird für 10 Minuten zur Äquilibration auf dem Harz belassen, anschließend wird die Elution mit einer Rate von nicht mehr als 20 ml/min fortgesetzt und das Eluat in demselben Rundkolben aufgefangen. Das Methanol wird am Rotationsverdampfer (4.2) abgedampft, wobei die Badtemperatur 40 °C nicht übersteigen sollte. Der Rückstand wird unter Verwendung der mobilen Phase (3.21) quantitativ in einen 10-ml-Meßkolben überführt. Es wird mit der mobilen Phase zur Marke aufgefüllt und gemischt. Ein Aliquot wird durch ein Membranfilter (4.7) filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.4) aufbewahrt.

5.4. HPLC-Bestimmung

5.4.1. Bedingungen

Die folgenden Bedingungen sind Richtwerte; andere Bedingungen können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Trennsäule (4.4.1)

Mobile Phase für die HPLC (3.21)

Fließgeschwindigkeit: 1,5 — 2 ml/min

Detektionswellenlänge: 243 nm

Einspritzvolumen: 40 — 100 µl

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Eichlösung (3.6.2), die 3,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (-flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.4.2. Eichkurve

Jede Eichlösung (3.6.2) wird mehrmals eingespritzt, und die Peakhöhen (-flächen) für die einzelnen Konzentrationen werden gemessen. Es wird eine Eichkurve gezeichnet, indem die mittleren Peakhöhen oder -flächen auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.4.3. Probenlösung

Der Probenextrakt (5.3.2) wird mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Eichlösungen verwendet wird, und die mittlere Peakhöhe (-fläche) der Halofuginonpeaks wird ermittelt.

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Peakhöhe (-fläche) der Halofuginonpeaks der Probenlösung wird anhand der Eichkurve (5.4.2) die Konzentration in µg/ml in der Probenlösung bestimmt.

Der Halofuginongehalt w in mg/kg der Probe ergibt sich aus folgender Formel:

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

Hier bei sind:

— c : Halofuginonkonzentration der Probenlösung in µg/ml

— m : Probeneinwaage in g

7. Überprüfung der Ergebnisse

7.1. Identität

Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie oder mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bestätigt werden, wobei die Spektren der Probenlösung und der Eichlösung (3.6.2), die 6,0 µg/ml enthält, verglichen werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein Probenextrakt wird mit einer geeigneten Menge einer Eichlösung (3.6.2) versetzt. Die Menge des zugesetzten Halofuginons sollte dem erwarteten Halofuginongehalt des Probenextraktes entsprechen. Unter Berücksichtigung der zugefügten Menge und der Verdünnung des Extraktes darf nur der Halofuginonpeak erhöht werden.

7.1.2. Diodenarray-Detektion

Die Ergebnisse werden gemäß den nachstehenden Merkmalen beurteilt:

- Die maximalen Absorptionswellenlängen des Proben- und des Standard-Spektrums, aufgezeichnet an den Peakspitzen des Chromatogramms, müssen innerhalb eines Spielraumes, der durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird, übereinstimmen. Für die Diodenarray-Detektion liegt dieser Spielraum bei ± 2 nm.
- Zwischen 255 und 300 nm dürfen die Proben und Standardspektren, aufgezeichnet an den Peakspitzen des Chromatogramms, in den Bereichen, die zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption liegen, keine Unterschiede aufweisen. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung zwischen den beiden Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums an der Peakspitze beträgt.
- Zwischen 225 und 300 nm dürfen die Spektren des Probenextraktes, aufgezeichnet im Anstieg, an der Spitze und im Abstieg des Probenpeaks, in den Teilen des Spektrums, der im Bereich zwischen 10 % und 100 % relativer Absorption liegt, keine Unterschiede aufweisen. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn die gleichen Maxima vorliegen und die Abweichung der Spektren an keinem Beobachtungspunkt mehr als 15 % der Absorption des Spektrums an der Peakspitze beträgt.

Wird eines dieser Kriterien nicht erfüllt, gilt das Vorhandensein des Analyten als nicht bestätigt.

7.2. Wiederholbarkeit

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen von zwei Parallelbestimmungen darf bei ein und derselben Probe 0,5 mg/kg für einen Halofuginongehalt bis zu 3 mg/kg nicht überschreiten.

7.3. Wiederfindung

Für eine dotierte Probe sollte die Wiederfindung mindestens 80 % betragen.

8. Ergebnisse einer Ringuntersuchung

Es wurde eine Ringuntersuchung durchgeführt, bei der drei Proben von acht Laboratorien untersucht wurden (¹).

Ergebnisse

	Probe A (Blindprobe) nach Erhalt	Probe B (Mehl)		Probe C (Pellets)	
		nach Erhalt	nach 2 Monaten	nach Erhalt	nach 2 Monaten
Mittel (¹)	N.N.	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
VK _R	—	16	18	14	17
Wdf.		86	74	88	75

(¹): in mg/kg.

N.N.: nicht nachweisbar.

S_R: Vergleichsstandardabweichung.

VK_R: Variationskoeffizient (%).

Wdf: Wiederfindung (%).

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