DIRETTIVA 1999/76/CE DELLA COMMISSIONE

del 23 luglio 1999

che fissa i metodi di analisi comunitari per la determinazione del lasalocid sodico negli alimenti per animali

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali [1], modificata da ultimo dall'atto di adesione dell'Austria, della Finlandia e della Svezia, in particolare l'articolo 2,

(1) considerando che la direttiva 70/373/CEE prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali volti a costatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative concernenti la qualità e la composizione degli alimenti per animali siano effettuati secondo metodi comunitari di prelievo di campioni e di analisi;

(2) considerando che la direttiva 70/524/CEE del Consiglio, del 23 novembre 1970, relativa agli additivi nell'alimentazione degli animali [2], modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 866/1999 della Commissione [3] prescrive che il contenuto di lasalocid sodico deve essere indicato nell'etichettatura allorché tali sostanze sono aggiunte alle premiscele e agli alimenti per animali;

(3) considerando che ai fini dei necessari controlli è necessario stabilire metodi comunitari di analisi;

(4) considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente degli alimenti per animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali e delle premiscele, per quanto riguarda il loro contenuto di lasalocid, siano effettuate secondo il metodo descritto nell'allegato.

Articolo 2

Gli Stati membri metttono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva non oltre il 31 gennaio 2000. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Essi applicano le misure a partire dal 1º febbraio 2000.

Quando gli Stati membri adottano dette disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva oppure sono corredate di un siffato riferimento all'atto della loro pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 3

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 23 luglio 1999.

Per la Commissione

Franz FISCHLER

Membro della Commissione

[1] GU L 170 del 3.8.1970, pag. 2.
[2] GU L 270 del 14.12.1970, pag. 1.
[3] GU L 108 del 27.4.1999, pag. 20.

ALLEGATO

DETERMINAZIONE DEL LASALOCID SODICO

Sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da Streptomyces lasaliensis

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il presente metodo serve per la determinazione del lasalocid sodico negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rivelazione è di 5 mg/kg, il limite di determinazione è di 30 mg/kg.

2. **Principio**

Il lasalocid sodico viene estratto dal campione in metanolo acidificato e viene determinato per cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) a fase inversa, impiegando un rivelatore spettrofluorimetrico.

3. **Reattivi**

3.1. Fosfato biacido di potassio (KH_2P0_4)

3.2. Acido ortofosforico, w = 85 %

3.3. Soluzione di acido ortofosforico, σ = 20 %

Diluire con acqua 23.5 ml di acido ortofosforico (3.2) e portare a 100 ml

3.4. 6-metil-2-eptilammina (1,5-dimetilesilammina), w = 99 %

3.5. Metanolo, qualità per HPLC

3.6. Acido cloridrico, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7. Soluzione tampone fosfato, c = 0,01 mol/l

In 500 ml di acqua (3.11) sciogliere 1,36 g di KH_2P0_4 (3.1), aggiungere 3,5 ml di acido ortofosforico (3.2) e 10,0 ml di 6-metil-2-eptilammina (3.4). Portare il pH a 4,0 con soluzione di acido ortofosforico (3.3) e diluire a 1 000 ml con acqua (3.11).

3.8. Metanolo acidificato

Trasferire 5,0 ml di acido cloridrico (3.6) in un matraccio tarato da 1 000 ml, portare a volume con metanolo (3.5) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

3.9. Fase mobile per HPLC, soluzione tampone fosfato-metanolo 5 + 95 (V + V)

Mescolare 5 ml di soluzione tampone fosfato (3.7) con 95 ml di metanolo (3.5)

3.10. Sostanza di riferimento lasalocid sodico, di purezza garantita, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da Streptomyces lasaliensis), E763

3.10.1. Soluzione madre di riserva di lasalocid sodico, 500 µg/ml

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare (a meno di 0,1 mg) 50 mg di lasalocid sodico (3.10), sciogliere in metanolo acidificato (3.8), portare a volume con lo stesso solvente e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

3.10.2. Soluzione madre intermedia di lasalocid sodico, 50 µg/ml

In un matraccio tarato da 100 ml, pipettare 10,0 ml di soluzione madre di riserva (3.10.1), portare a volume con metanolo acidificato (3.8) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

3.10.3. Soluzioni di taratura

In una serie di matracci tarati da 50 ml trasferire 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml di soluzione madre intermedia (3.10.2). Portare a volume con metanolo acidificato (3.8) e mescolare. Queste soluzioni corrispondono a 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg, 5,0 µg e 10,0 µg di lasalocid sodico per ml, rispettivamente. Esse vanno preparate estemporaneamente prima dell'uso.

3.11. Acqua, qualità per HPLC

4. **Apparecchiature**

4.1. Bagno ad ultrasuoni (o bagno con agitatore in acqua), con sistema di termoregolazione

4.2. Filtri a membrana, 0,45 µm

4.3. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato per volumi da 20 µl

4.3.1. Colonna analitica da 125 mm × 4 mm, a fase inversa C 18, riempimento 5 µm, o equivalente

4.3.2. Spettrofluorimetro con regolazione a lunghezza d'onda variabile di lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione

5. **Modo di operare**

5.1. Generalità

5.1.1. «Bianco»

Per eseguire la prova di recupero (5.1.2) è necessario disporre di un mangime di riferimento («bianco»), nel quale dev'essere verificata l'assenza di lasalocid sodico e di sostanze capaci di interferire. L'analisi non deve evidenziare la presenza di quantità rivelabili di lasalocid sodico o di sostanze capaci di interferire.

5.1.2. Prova di recupero

Deve essere eseguita una prova di recupero analizzando il «bianco» addizionato di una quantità di lasalocid sodico analoga a quella presente nel campione. Per portare il bianco addizionato al livello di 100 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre di riserva (3.10.1) in un matraccio conico da 250 ml e far evaporare la soluzione a circa 0,5 ml. Aggiungere 50 g del bianco, mescolare il tutto e attendere per 10 minuti, agitando più volte, prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un «bianco» di tipo simile a quello del campione (cfr. 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di lasalocid sodico, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme ad una del campione non addizionato, e il recupero può essere calcolato per differenza.

5.2. Estrazione

5.2.1. Alimenti per animali

In una beuta da 250 ml con tappo, pesare (a meno di 0,01 g) da 5 g a 10 g del campione. Aggiungere con pipetta 100,0 ml di metanolo acidificato (3.8). Chiudere in modo approssimato e roteare per disperdere. Collocare la beuta in un bagno ad ultrasuoni (4.1) a circa 40 °C per 20 minuti; quindi toglierla e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente. Lasciare riposare per circa un'ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (4.2) in un contenitore adeguato. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.2.2. Premiscele

In un matraccio tarato, pesare (a meno di 0,001 g) circa 2 g di premiscela non miscelata. Aggiungere 100,0 ml di metanolo acidificato (3.8) e scuotere per disperdere. Collocare il matraccio in un bagno ad ultrasuoni (4.1) a circa 40 °C per 20 minuti; quindi toglierlo e lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Diluire sino alla tacca con metanolo acidificato (3.8) e mescolare accuratamente. Lasciare riposare per un'ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare successivamente un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (4.2). Diluire un volume adeguato di filtrato chiaro con metanolo acidificato (3.8) ottenendo così una soluzione di prova finale contenente circa 4 µg/ml di lasalocid sodico. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo di orientamento; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna analitica (4.3.1):	125 mm × 4 mm, a fase inversa C18, riempimento 5 µm o equivalente
Fase mobile (3.9):	miscela di soluzione tampone fosfato (3.7) e metanolo (3.5), 5 + 95 (V + V)
Velocità di efflusso:	1,2 ml/min
Lunghezze d'onda di rivelazione:	
— Eccitazione:	310 mm
— Emissione:	419 mm
Volume di iniezione:	20 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.10.3) contenente 4,0 µg/ml, fino a costanza delle altezze (o delle aree) delle cuspidi e dei tempi di ritenzione.

5.3.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.10.3) varie volte, e determinare le altezze (le superfici) medie delle cuspidi per ciascuna concentrazione. Tracciare la curva di taratura, riportando in ordinata le altezze (le superfici) medie delle cuspidi e in ascissa le corrispondenti concentrazioni, espresse in µg/ml.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte gli estratti dei campioni di 5.2.1 o 5.2.2, impiegando lo stesso volume di quello prelevato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (le superfici) medie delle cuspidi del lasalocid sodico.

6. **Calcolo dei risultati**

Partendo dall'altezza media di cuspide (superficie) ottenuta per iniezione della soluzione del campione (5.3.3), determinare la concentrazione del lasalocid sodico (µg/ml), riportandosi alla curva di taratura.

6.1. Alimenti per animali

Il contenuto w di lasalocid sodico nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} \quad [mg/kg]$$

dove:
β =concentrazione di lasalocid sodico nella soluzione del campione (5.2.1), in µg/ml
V_1 =volume dell'estratto del campione secondo 5.2.1 (cioè: 100), in ml
m =massa dell'aliquota analizzata in g

6.2. Premiscele

Il contenuto w di lasalocid sodico nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} \quad [mg/kg]$$

dove:
β =concentrazione di lasalocid sodico nella soluzione del campione (5.2.2), in µg/ml
V_2=volume dell'estratto del campione secondo 5.2.2 (cioè: 250), in ml
f =fattore di diluizione secondo 5.2.2
m =massa dell'aliquota analizzata in g

7. **Convalida dei risultati**

7.1. Identità

I metodi basati sulla spettrofluorimetria sono meno soggetti ad interferenza di quelli in cui si fa ricorso alla rivelazione UV. L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia.

7.1.1. Co-cromatografia

Ad un estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) viene aggiunto un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.10.3). Il quantitativo di lasalocid sodico aggiunto deve essere analogo a quello di lasalocid sodico trovato nell'estratto del campione. Deve essere aumentata soltanto l'altezza della cuspide del lasalocid sodico tenendo conto della quantità di lasalocid aggiunto e della diluizione dell'estratto. La larghezza della cuspide a metà altezza non deve differire di oltre ± 10 % della larghezza iniziale della cuspide prodotta dall'estratto del campione non addizionato.

7.2. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni in parallelo, effettuate sullo stesso campione, non deve superare:

— il 15 % del valore più elevato per i contenuti di lasalocid sodico compresi fra 30 mg/kg e 100 mg/kg;

— 15 mg/kg per contenuti di lasalocid sodico compresi fra 100 mg/kg e 200 mg/kg;

— il 7,5 % del valore più elevato per i contenuti di lasalocid sodico oltre 200 mg/kg.

7.3. Ricupero

Per il campione addizionato (bianco) di mangime, il recupero non deve essere inferiore all'80 %. Per i campioni addizionati di premiscela, il recupero non deve essere inferiore al 90 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo ([1]) in cui sono stati analizzati 2 premiscele (campioni 1 e 2) e 5 mangimi (campioni 3-7) da 12 laboratori. Su ciascun campione sono state eseguite analisi in doppio. I risultati sono riportati nella tabella che segue:

([1]) Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

	Campione 1 Polli premiscela	Campione 2 Tacchini premiscela	Campione 3 Tacchini pellets	Campione 4 Polli granuli	Campione 5 Tacchini mangime	Campione 6 Pollame mangime A	Campione 7 Pollame mangime B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Media (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
S_r (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
S_R (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Contenuto nominale (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50[+]	35[+]

L= numero di laboratori.
N= numero di valori singoli.
S_r: deviazione standard della ripetibilità.
S_R: deviazione standard della riproducibilità.
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità.
CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilitè.
* Contenuto dichiarato dal fabbricante.
[+] Mangime preparato nel laboratorio.