RICHTLIJN 1999/76/EG VAN DE COMMISSIE

van 23 juli 1999

tot vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de bepaling van het gehalte aan lasalocide-natrium van diervoeders

(Voor de EER relevante tekst)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese 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 veevoeders [1], laatstelijk gewijzigd bij de Akte van Toetreding van Oostenrijk, Finland en Zweden, en met name op artikel 2,

(1) Overwegende dat in Richtlijn 70/373/EEG is bepaald dat de officiële controle van veevoeders welke ertoe strekt na te gaan of aan de op grond van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de kwaliteit en de samenstelling van veevoeders gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens communautaire bemonsterings- en analysemethoden;

(2) Overwegende dat in Richtlijn 70/524/EEG van de Raad van 23 november 1970 betreffende toevoegingsmiddelen in de diervoeding [2], laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 866/1999 van de Commissie [3], is bepaald dat het gehalte aan lasalocide-natrium in de etikettering moet worden aangegeven, wanneer deze stoffen aan voormengsels en diervoeders worden toegevoegd;

(3) Overwegende dat analysemethoden moeten worden vastgesteld voor de controle op die stoffen;

(4) Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Comité voor veevoeder,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De lidstaten schrijven voor dat de analyses in het kader van de officiële controle van diervoeders en voormengsels op het gehalte aan lasalocide-natrium worden uitgevoerd volgens de in de bijlage beschreven methoden.

Artikel 2

De lidstaten doen uiterlijk op 31 januari 2000 de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om aan de bepalingen van deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onmiddellijk in kennis.

Zij passen de maatregelen toe met ingang van 1 februari 2000.

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

Artikel 3

Deze richtlijn treedt in werking op de twintigste dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Artikel 4

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 23 juli 1999.

Voor de Commissie

Franz FISCHLER

Lid van de Commissie

[1] PB L 170 van 3.8.1970, blz. 2.
[2] PB L 270 van 14.12.1970, blz. 1.
[3] PB L 108 van 27.4.1999, blz. 20.

BIJLAGE

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN LASALOCIDE-NATRIUM

Natriumzout van door Streptomyces lasaliensis geproduceerd polyether monocarbonzuur

1. **Doel en toepassingsgebied**

De methode dient voor de bepaling van lasalocide-natrium in dierenvoeders en voormengsels. De detectiegrens is 5 mg/kg, de bepaalbaarheidsgrens is 30 mg/kg.

2. **Principe**

Lasalocide-natrium wordt uit het monster geëxtraheerd met aangezuurde methanol, en het gehalte wordt bepaald met reversed-phase hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) met fluorimetrische detectie.

3. **Reagentia**

3.1. Kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4)

3.2. Fosforzuur, w = 85 %

3.3. Fosforzuuroplossing, σ = 20 %

Verdun 23,5 ml fosforzuur (3.2) met water tot 100 ml.

3.4. 6-methyl-2-heptylamine (1,5-dimethylhexylamine), w = 99 %

3.5. Methanol, HPLC-kwaliteit

3.6. Zoutzuur, p_{20} 1,19 g/ml

3.7. Fosfaatbufferoplossing, c = 0,01 mol/l

Los 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) op in 500 ml water (3.11), voeg 3,5 ml fosforzuur (3.2) toe en 10,0 ml 6-methyl-2-heptylamine (3.4). Breng de pH op 4,0 met een fosforzuuroplossing (3.3) en verdun tot 1 000 ml met water (3.11).

3.8. Aangezuurde methanol

Breng 5,0 ml zoutzuur (3.6) over in een maatkolf van 1 000 ml, vul aan tot de maatstreep met methanol (3.5) en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.9. HPLC mobiele fase, fosfaatbufferoplossing-methanol, 5 + 95 (V + V)

Meng 5 ml van de fosfaatbufferoplossing (3.7) met 95 ml methanol (3.5).

3.10. Lasalocide-natrium standaardstof van gegarandeerde zuiverheid, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (natriumzout van door Streptomyces lasaliensis geproduceerd polyether monocarbonzuur), E763

3.10.1. Lasalocide-natrium standaard stockoplossing, 500 µg/ml

Weeg 50 mg lasalocide-natrium (3.10) tot op 0,1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 100 ml en los op in aangezuurde methanol (3.8), vul aan tot de maatstreep met hetzelfde oplosmiddel en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.10.2. Lasalocide-natrium standaard werkoplossing, 50 µg/ml

Pipetteer 10,0 ml van de standaard stockoplossing (3.10.1) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de maatstreep met aangezuurde methanol (3.8) en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.10.3. IJkoplossingen

Breng 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 en 10,0 ml standaard werkoplossing (3.10.2) in een reeks maatkolven van 50 ml. Vul aan tot de maatstreep met aangezuurde methanol (3.8) en meng. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 en 10,0 µg lasalocide-natrium per ml. Deze oplossingen moeten direct vóór gebruik worden bereid.

3.11. Water, HPLC-kwaliteit.

4. **Apparatuur**

4.1. Ultrasoonbad (of schudmachine in een waterbad) met temperatuurregeling

4.2. Membraanfilters, 0,45 µm

4.3. HPLC-apparatuur met injectiesysteem, geschikt voor injectiehoeveelheden van 20 µl

4.3.1. HPLC-kolom, 125 mm x 4 mm, reversed-phase C18, vulling van 5 µm, of een soortgelijke kolom

4.3.2. Spectrofluorimeter met variabele excitatie- en emissiegolflengten.

5. **Werkwijze**

5.1. Algemeen

5.1.1. Blanco diervoeder

Voor de bepaling van de recovery (5.1.2) dient een blanco voedermonster te worden geanalyseerd om te controleren of noch lasalocide-natrium noch storende stoffen aanwezig zijn. Het blanco voedermonster dient van een vergelijkbare soort te zijn als het monster, en lasalocide-natrium of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

5.1.2. Recovery

De recovery dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een hoeveelheid lasalocide-natrium is toegevoegd die vergelijkbaar is met die in het monster. Breng voor een gehalte van 100 mg/kg 10,0 ml van de standaard stockoplossing (3.10.1) over in een erlenmeyer van 250 ml en damp de oplossing in tot ongeveer 0,5 ml. Voeg 50 g van het blanco diervoeder toe, meng grondig en laat dit mengsel gedurende 10 minuten staan, waarbij tussentijds nog enkele malen gemengd wordt alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Als een blanco diervoeder van een vergelijkbare soort niet beschikbaar is (zie 5.1.1), kan de recovery ook worden bepaald met de standaardadditiemethode. Hierbij wordt aan het te analyseren monster een hoeveelheid lasalocide-natrium toegevoegd die vergelijkbaar is met die in het monster. Dit monster wordt geanalyseerd samen met het monster waaraan geen lasalocide-natrium is toegevoegd, en de recovery kan dan door aftrekking worden berekend.

5.2. Extractie

5.2.1. Dierenvoeders

Weeg 5 tot 10 g van het monster tot op 0,01 g nauwkeurig af in een afsluitbare erlenmeyer van 250 ml. Voeg 100,0 ml aangezuurde methanol (3.8) toe met behulp van een pipet. Sluit niet te strak af en draai de erlenmeyer rond om te dispergeren. Plaats de erlenmeyer gedurende 20 minuten in het ultrasoonbad (4.1) bij ongeveer 40 °C, haal hem eruit en koel hem af tot kamertemperatuur. Laat ongeveer 1 uur staan totdat het in suspensie verkerende materiaal is gesedimenteerd, filtreer vervolgens een fractie door een membraanfilter van 0,45 µm (4.2) in een daartoe geschikt monsterflesje. Voer de HPLC-bepaling uit (5.3).

5.2.2. Voormengsels

Weeg 2 g van het niet-gemalen voormengsel tot op 0,001 g nauwkeurig af in een maatkolf van 250 ml. Voeg 100,0 ml aangezuurde methanol (3.8) toe en draai de maatkolf rond om te dispergeren. Plaats de maatkolf met inhoud gedurende 20 minuten in het ultrasoonbad (4.1) bij ongeveer 40 °C, haal hem eruit en koel hem af tot kamertemperatuur. Verdun door aangezuurde methanol (3.8) toe te voegen tot de maatstreep en meng grondig. Laat ongeveer 1 uur staan totdat het in suspensie verkerende materiaal is gesedimenteerd, filtreer vervolgens een fractie door een membraanfilter van 0,45 µm (4.2). Verdun een zodanige hoeveelheid van het heldere filtraat met aangezuurde methanol (3.8) ter verkrijging van een testoplossing met ongeveer 4 µg/ml lasalocide-natrium. Voer de HPLC-bepaling (5.3) uit.

5.3. HPLC-bepaling

5.3.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad gegeven; andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

HPLC-kolom (4.3.1):	125 mm × 4 mm, reversed-phase C18, vulling van 5 µm, of een soortgelijke kolom
Mobiele fase (3.9):	Mengsel van fosfaatbufferoplossing (3.7) en methanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Elutiesnelheid:	1,2 ml/min
Detectiegolflengten:	
— Excitatiegolflengte:	310 nm
— Emissiegolflengte:	419 nm
Injectievolume:	20 µl

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.10.3) van 4,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten (of -oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.3.2. IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.10.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.3.3. Monsteroplossing

Injecteer de in 5.2.1 en 5.2.2 verkregen monsterextracten enige malen waarbij hetzelfde injectievolume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt en bepaal de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) van de lasalocide-natrium-pieken.

6. **Berekening van de resultaten**

Bereken uit de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) die door injectie van de monsteroplossing (5.3.3) tot stand is gekomen, het gehalte aan lasalocide-natrium (µg/ml) op basis van de ijklijn.

6.1. Dierenvoeders

Het gehalte aan lasalocide-natrium w (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

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

waarbij:
β = het gehalte lasalocide-natrium van de monsteroplossing (5.2.1) in µg/ml
V_1 = volume van het monsterextract volgens 5.2.1 in ml (d.w.z. 100)
m = massa van het monster in g.

6.2. Voormengsels

Het gehalte aan lasalocide-natrium w (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

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

waarbij:
β = het gehalte lasalocide-natrium van de monsteroplossing (5.2.2) in µg/ml
V_2 = volume van het monsterextract volgens 5.2.2 in ml (d.w.z. 250)
f = verdunningsfactor volgens 5.2.2
m = massa van het monster in g.

7. **Validatie van de resultaten**

7.1. Identiteit

Op fluorimetrische detectie gebaseerde methoden zijn minder aan storing onderhevig dan die waarbij UV-detectie wordt toegepast. De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden vastgesteld door cochromatografie.

7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2.1 of 5.2.2) een juiste hoeveelheid van een ijkoplossing (3.10.3) toe. De hoeveelheid toegevoegd lasalocide-natrium moet ongeveer even groot zijn als de in het monsterextract gevonden hoeveelheid. Alleen de hoogte van de lasalocide-natriumpiek mag toenemen tot een hoeveelheid waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale piekhoogte moet binnen ±10 % liggen van de breedte van het monster waaraan geen lasalocide-natrium is toegevoegd.

7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag:

— bij een gehalte aan lasalocide-natrium tussen 30 mg/kg en 100 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bedragen;

— bij een gehalte aan lasalocide-natrium tussen 100 mg/kg en 200 mg/kg niet meer dan 15 mg/kg bedragen;

— bij een gehalte aan lasalocide-natrium van meer dan 200 mg/kg niet meer dan 7,5 % van het hoogste resultaat bedragen.

7.3. Recovery

Voor het (blanco) voedermonster met toevoeging dient de recovery ten minste 80 % te bedragen. Voor het blanco voormengselmonster met toevoeging dient de recovery ten minste 90 % te bedragen.

8. **Resultaten van een ringonderzoek**

Een ringonderzoek [1] heeft plaatsgevonden waarbij twee voormengsels (monsters 1 en 2) en vijf soorten voeder (monsters 3 tot en met 7) zijn onderzocht door twaalf laboratoria. Elk monster werd in duplo geanalyseerd. De resultaten staan in de volgende tabel.

[1] Analyst, 1995, 120, 2175-2180

	Monster 1 Voormengsel voor kippen	Monster 2 Voormengsel voor kalkoenen	Monster 3 Pellets voor kalkoenen	Monster 4 Voederbrokjes voor kippen	Monster 5 Voeder voor kalkoenen	Monster 6 Voeder voor kippen A	Monster 7 Voeder voor kippen B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Gemiddeld (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
Theoretisch gehalte (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50+	35+

L= aantal laboratoria.
n= aantal bepalingen.
S_r= standaardafwijking van de herhaalbaarheid.
S_R= standaardafwijking van de reproduceerbaarheid.
CV_r= variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, in %.
CV_R= variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid, in %.
* door de fabrikant opgegeven gehalte.
+ in het laboratorium bereid voeder.