ΟΔΗΓΙΑ 1999/76/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 23ης Ιουλίου 1999

για την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων ανάλυσης για τον προσδιορισμό του άλατος του lasalocid με νάτριο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 70/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 20ής Ιουλίου 1970, περί εισαγωγής τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων κοινοτικής αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την πράξη προσχώρησης της Αυστρίας, της Φινλανδίας και της Σουηδίας, και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

(1) ότι η οδηγία 70/373/ΕΟΚ, ορίζει ότι οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών που έχουν σκοπό να διαπιστώσουν την τήρηση των όρων που αναφέρονται στις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που αφορούν την ποιότητα και τη σύνθεσή τους πρέπει να γίνονται σύμφωνα με κοινοτικούς τρόπους λήψης δειγμάτων και μεθόδους ανάλυσης·

(2) ότι η οδηγία 70/524/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 23ης Νοεμβρίου 1970, περί των προσθέτων υλών στη διατροφή των ζώων [2], όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 866/1999 της Επιτροπής [3], ορίζει ότι η περιεκτικότητα σε άλας του lasalocid με νάτριο πρέπει να αναφέρεται στην επισήμανση εφόσον σε προμείγματα και ζωοτροφές έχει προστεθεί η ουσία αυτή·

(3) ότι πρέπει να καθιερωθούν κοινοτικές μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο αυτών των ουσιών·

(4) ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για τις ζωοτροφές,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε οι αναλύσεις για τον επίσημο έλεγχο της περιεκτικότητας των ζωοτροφών και των προμιγμάτων σε άλας του lasalocid με νάτριο να πραγματοποιούνται με τις μεθόδους που καθορίζονται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ, το αργότερο μέχρι την 31η Ιανουαρίου 2000, τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι αναγκαίες για τη συμμόρφωσή τους με την παρούσα οδηγία. Ενημερώνουν αμέσως σχετικά την Επιτροπή.

Τα κράτη μέλη εφαρμόζουν τα μέτρα αυτά από την 1η Φεβρουαρίου 2000.

Όταν οι εν λόγω διατάξεις θεσπίζονται από τα κράτη μέλη, περιέχουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από σχετική παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομέρειες της παραπομπής αυτής καθορίζονται από τα κράτη μέλη.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 23 Ιουλίου 1999.

Για την Επιτροπή

Franz FISCHLER

Μέλος της Επιτροπής

[1] ΕΕ L 170 της 3.8.1970, σ. 2.
[2] ΕΕ L 270 της 14.12.1970, σ. 1.
[3] ΕΕ L 108 της 27.4.1999, σ. 20.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΤΟΥ LASALOCID ΜΕ ΝΑΤΡΙΟ

Άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον Streptomyces lasaliernis

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του άλατος του lasalocid με νάτριο σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 5 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 30 mg/kg.

2. **Αρχή της μεθόδου**

Το άλας του lasalocid με νάτριο εκχυλίζεται από το δείγμα σε οξυνισμένη μεθανόλη και προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανεστραμμένης φάσης με χρήση φασματοφθορισμομετρικού ανιχνευτή.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)

3.2. Ορθοφωσφορικό οξύ, w = 85 %

3.3. Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος, σ = 20 %

Διαλύονται 23.5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.2.) σε 100 ml με νερό.

3.4. 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνη (1,5-διμεθυλεξυλαμίνη), w = 99 %

3.5. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC

3.6. Υδροχλωρικό οξύ, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, c = 0,01 mol/l

Διαλύονται 1,36 g KH_2PO_4 (3.1.) σε 500 ml νερού (3.11.), προστίθενται 3,5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.2.) και 10,0 ml 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνης (3.4.). Ρυθμίζεται το pH σε 4,0 με διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος (3.3.) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 με νερό (3.11.).

3.8. Οξυνισμένη μεθανόλη

5,0 ml υδροχλωρικού οξέος (3.6.) μεταγγίζονται σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.5.) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση του.

3.9. Κινητή φάση για την HPLC, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων-διάλυμα μεθανόλης σε αναλογία 5 + 95 (V + V)

Αναμειγνύονται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (3.7.) με 95 ml μεθανόλης (3.5.).

3.10. Πρότυπη ουσία άλατος lasalocid με νάτριο εγγυημένης καθαρότητας, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον Streptomyces lasaliensis), E763

3.10.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg άλατος lasalocid με νάτριο (3.10.), διαλύονται σε οξυνισμένη μεθανόλη (3.8.), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση του.

3.10.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 50 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml φέρονται με σιφώνιο 10,0 ml του μητρικού πρότυπου διαλύματος (3.10.1.) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8.) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση του.

3.10.3. Διαλύματα αναφοράς

1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 ml του ενδιαμέσου πρότυπου διαλύματος (3.10.2.) μεταγγίζονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8.) και οι φιάλες ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 μg/ml άλατος lasalocid με νάτριο αντιστοίχως. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση του.

3.11. Νερό καθαρότητας HPLC

4. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

4.1. Λουτρό υπερήχων (ή ανακινούμενο υδατόλουτρο) με ελεγχόμενη θερμοκρασία.

4.2. Διηθητικές μεμβράνες, 0,45 μm

4.3. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα εγχύσεως, κατάλληλο για έγχυση όγκων 20 μl.

4.3.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 125 mm × 4 mm, υλικό πλήρωσης ανεστραμμένης φάσης C 18,5 μm ή ισοδύναμη

4.3.2. Φασματοφθορισμόμετρο με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής.

5. **Διαδικασία**

5.1. Γενικά

5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2.), θα πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε άλας του lasalocid με νάτριο ούτε κάποια άλλη παρεμποδιστική ουσία. Το τυφλό δείγμα θα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνο του δείγματος και δεν θα πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό άλας του lasalocid με νάτριο ή άλλες παρεμποδιστικές ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Θα πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας άλατος του lasalocid με νάτριο, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του μητρικού πρότυπου διαλύματος (3.10.1.) μεταγγίζονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επιμελώς και αφήνονται για 10′ αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχυλίσεως (5.2.).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε 5.1.), η δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα άλατος του lasalocid με νάτριο παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση

5.2.1. Ζωοτροφές

Σε κωνική φιάλη των 250 ml με πώμα ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,01 g, 5 έως 10 g του δείγματος. Προστίθενται με σιφώνιο 100,0 ml οξυνισμένης μεθανόλης (3.8.). Τοποθετείται χαλαρά το πώμα και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.1.) και αφήνεται για 20′ στους 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (4.2.) σε κατάλληλο δοχείο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3.).

5.2.2. Προμείγματα

Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,001 g, 2 g του μη αλεσμένου προμείγματος. Προστίθενται 100,0 ml οξυνισμένης μεθανόλης (3.8.) και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη με το περιεχόμενό της τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.1.) και αφήνεται για 20′ σε θερμοκρασία περίπου 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8.) και αναμειγνύεται επιμελώς. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, στη συνέχεια καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (4.2.). Κατάλληλος όγκος του διαυγούς διηθήματος αραιώνεται με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8.) για να ληφθεί το τελικό διάλυμα της δοκιμής που περιέχει περίπου 4 μg/ml άλατος lasalocid με νάτριο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3.).

5.3. Προσδιορισμός με HPLC

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες· μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα:

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.3.1):	125 mm × 4 mm, υλικό πλήρωσης ανεστραμμένης φάσης C18,5 μm ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.9.):	Μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (3.7.) και μεθανόλης (3.5.), 5 + 95 (V + V)
Παροχή:	1,2 ml/min
Μήκη κύματος για την ανίχνευση:	
— Διέγερσης:	310 mm
— Εκπομπής:	419 mm
Εγχεόμενος όγκος:	20 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχέοντας μερικές φορές το διάλυμα αναφοράς (3.10.3.) που περιέχει 4,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα αναφοράς (3.10.3.) εγχέεται μερικές φορές και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων αναφοράς και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχέεται μερικές φορές το εκχύλισμα του δείγματος (5.2.) χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του άλατος lasalocid με νάτριο.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml προσδιορίζεται από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών τον άλατος lasalocid με νάτριο του διαλύματος του δείγματος βάσει της καμπύλης αναφοράς (5.3.3.)

6.1. Ζωοτροφές

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο w (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

β = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (5.2.1.) σε μg/ml

V_1 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με το 5.2.1. σε ml (δηλαδή 100)

m = μάζα του δείγματος δοκιμής σε g

6.2. Προμείγματα

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο w (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

β = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (5.2.2.) σε μg/ml

V_2 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με το 5.2.2. σε ml (δηλαδή 250)

f = συντελεστής αραιώσεως σύμφωνα με το 5.2.2.

m = μάζα του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. Ταυτότητα

Οι φασματοφθορισμομετρικές μέθοδοι είναι λιγότερο εκτεθειμένες σε παρεμβολές σε σύγκριση με αυτές που χρησιμοποιούν ανιχνευτή υπεριώδους. Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (5.2.1. ή 5.2.2.) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος αναφοράς (3.10.3.). Η ποσότητα του προστιθέμενου άλατος lasalocid με νάτριο θα πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του άλατος lasalocid με νάτριο που βρίσκεται στο εκχύλισμα. Πρέπει να αυξάνεται μόνον το ύψος της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο ανάλογα με την προστιθέμενη ποσότητα και την αραίωση του εκχυλίσματος. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, πρέπει να είναι ±10 % του αρχικού πλάτους της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.2. Ενδοεργαστηριακή επαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο από 30 mg/kg έως 100 mg/kg,

— τα 15 mg/kg για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο μεταξύ 100 mg/kg και 200 mg/kg,

— 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο άνω των 200 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Για το εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %. Για τα εμπλουτισμένα δείγματα προμειγμάτων, η ανάκτηση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή [1] μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 2 προμείγματα (δείγματα 1 και 2) και 5 ζωοτροφές (δείγματα 3 έως 7) από δώδεκα εργαστήρια. Η ανάλυση του κάθε δείγματος έγινε εις διπλούν. Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα.:

[1] Analyst, 1995, 120, σ. 2175-2180.

	Δείγμα 1 Πρόμειγμα για κοτόπουλα	Δείγμα 2 Πρόμειγμα για γαλοπούλες	Δείγμα 3 Σβόλοι για γαλοπούλες	Δείγμα 4 Θρύμματα για κοτόπουλα	Δείγμα 5 Ζωοτροφές για γαλοπούλες	Δείγμα 6 Ζωοτροφές για πουλερικά Α	Δείγμα 7 Ζωοτροφές για πουλερικά Β
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
μ.ο. (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
Ονομαστική περιεκτικότητα (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50+	35+

L= αριθμός εργαστηρίων.

n= αριθμός μεμονωμένων τιμών.

S_r: τυπική απόκλιση ενδοεργαστηριακής επαναληπτικότητας.

S_R: τυπική απόκλιση διεργαστηριακής επαναληπτικότητας.

CV_r: συντελεστής διακύμανσης ενδοεργαστηριακής επαναληπτικότητας, %.

CV_R: συντελεστής διακύμανσης διεργαστηριακής επαναληπτικότητας, %.

* περιεκτικότητα κατά δήλωση του παρασκευαστή.

+ ζωοτροφές που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.