KOMISSION DIREKTIIVI 1999/76/EY,

annettu 23 päivänä heinäkuuta 1999,

yhteisön menetelmistä lasalosid-natriumin määrittämiseksi

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmistä rehujen virallista tarkastusta varten 20 päivänä heinäkuuta 1970 annetun neuvoston direktiivin 70/373/ETY ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Itävallan, Suomen ja Ruotsin liittymisasiakirjalla, ja erityisesti sen 2 artiklan,

sekä katsoo, että

1) direktiivissä 70/373/ETY säädetään, että rehun laadusta ja koostumuksesta annettujen lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten noudattamisen valvomiseksi tehtävissä virallisissa takastuksissa on käytettävä yhteisön näytteenotto- ja määritysmenetelmiä,

2) rehujen lisäaineista 23 päivänä marraskuuta 1970 annetussa neuvoston direktiivissä 70/524/ETY ([2]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna komission asetuksella (EY) N:o 866/1999 ([3]), säädetään, että lasalosid-natriumpitoisuus on merkittävä pakkauksiin, kun näitä aineita lisätään esiseoksiin ja rehuun,

3) olisi vahvistettava yhteisön menetelmät kysisten aineiden valvomiseksi, ja

4) tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän rehukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on säädettävä, että määritettäessä lasalosidipitoisuuksia rehussa ja esiseoksissa virallisia tarkastuksia varten on käyttettävä tämän direktiivin liitteessä esitettyä menetelmää.

2 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 31 päivänä tammikuuta 2000. Jäsenvaltioiden on ilmoitettava niistä välittömästi komissiolle.

Jäsenvaltioiden on sovellettava näitä säännöksiä 1 päivästä helmikuuta 2000.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiivin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

3 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 23 päivänä heinäkuuta 1999.

Komission puolesta

Franz FISCHLER

Komission jäsen

([1]) EYVL L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) EYVL L 270, 14.12.1970, s. 1.
([3]) EYVL L 108, 27.4.1999, s. 20.

LIITE

LASALOSID-NATRIUMIN MÄÄRITTÄMINEN

Streptomyces lasaliensisin tuottama polyeetterimonokarboksyylihapon natriumsuola

1. **Tarkoitus ja soveltamisala**

Menetelmä on tarkoitettu lasalosid-natrium määrittämiseen rehusta ja esiseoksista. Havaitsemisraja on 5 mg/kg ja määritysraja 30 mg/kg.

2. **Periaate**

Lasalosid-natrium uutetaan näytteestä happamaan metanoliin ja määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla (HPLC) käyttäen spektrofluorimetridetektoria.

3. **Reagenssit**

3.1 Kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4)

3.2 Ortofosforihappo, w = 85 %

3.3 Ortofosforihappoliuos, σ = 20 %

Laimennetaan 23.5 ml ortofosforihappoa (3.2) vedellä 100 ml:aan.

3.4 6-metyyli-2-heptyyliamiini (1,5-dimetyyliheksyyliamiini), w = 99 %

3.5 Metanoli, HPLC-laatua

3.6 Suolahappo, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7 Fosfaattipuskuriliuos, c = 0,01 mol/1

Liuotetaan 1,36 g kaliumdivetyfosfaattia (3.1) 500 ml:aan vettä (3.11), lisätään 3,5 ml ortofosforihappoa (3.2) ja 10,0 ml 6-metyyli-2-heptyyliamiinia (3.4). Säädetään ortofosforihappoliuoksen avulla pH arvoon 4,0 ja laimennetaan vedellä (3.11) 1 000 ml:aan.

3.8 Hapan metanoli

Pipetoidaan 5,0 ml suolahappoa 1 000 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin metanolilla ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava välittömästi ennen käyttöä.

3.9 HPLC-ajoliuos, fosfaattipuskuri—metanoliliuos 5 + 95 (v + v).

Sekoitetaan 5 ml fosfaattipuskuriliuosta (3.7) ja 95 ml metanolia (3.5).

3.10 Lasalosid-natrium-standardiaine, jonka puhtaus on varmistettu, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (*Streptomyces lasaliensis*in tuottama polyeetterimonokarboksyylihapon natriumsuola), E763

3.10.1 Lasalosid-natriumstandardin kantaliuos, 500 µg/ml

Punnitaan 50 mg lasalosid-natriumia (3.10) 0,1 mg:n tarkkuudella 100 ml:n mittapulloon, liuotetaan happamaan metanoliin (3.8), täytetään merkkiin samalla liuottimella ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava välittömästi ennen käyttöä.

3.10.2 Lasalosid-natriumstandardin väliliuos, 50 µg/ml

Pipetoidaan 10,0 ml kantastandardiliuosta (3.10.1) 100 ml:n mittapulloon, täytetään merkkiin happamalla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan. Tämä liuos on valmistettava välittömästi ennen käyttöä.

3.10.3 Kalibrointiliuokset

Pipetoidaan 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 ml välistandardiliuosta (3.10.2) 50 ml:n mittapulloihin. Täytetään merkkiin happamalla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan. Nämä liuokset vastaavat konsentraatioita 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ja 10,0 µgml lasalosid-natriumia. Nämä liuokset on valmistettava välittömästi ennen käyttöä.

3.11 Vesi, HPLC-laatua

4. **Välineet**

4.1 Ultraäänihaude (tai ravisteleva vesihaude), jossa on lämpötilansäätö

4.2 Kalvosuodattimia, 0,45 µm ja 0,22 µm

4.3 HPLC-laitteisto, jossa voidaan injektoida 20 µl:n näytteitä

4.3.1 Nestekromatografiakolonni, 125 mm x 4 mm, käänteisfaasi C18, hiukkaskoko 5 µm tai vastaava

4.3.2 Spektrofluorimetri, jossa voidaan säätää eksitaatio- ja emissioaallonpituudet

5. **Menettely**

5.1 Yleistä

5.1.1 Nollanäyte

Saantokokeen (5.1.2) suorittamista varten analysoidaan nollanäyte, jotta varmistetaan, ettei se sisällä lasalosid-natriumia tai häiritseviä aineita. Nollanäytteen on oltava näytteen kaltainen, eikä siinä saa olla havaittavia määriä lasalosid-natriumia tai häiritseviä aineita.

5.1.2 Saantokoe

Saanto on määritettävä analysoimalla nollanäyte, johon on tehty näytteen lasalosid-natriumia vastaava lisäys. Jotta saadaan liuos, jossa on 100 mg/kg lasalosid-natriumia vastaava lisäys, siirretään 10,0 ml standardin kantaliuosta (3.10.1) 250 ml:n erlenmeyerkolviin ja haihdutetaan noin 0,5 ml:aan. Lisätään 50 g nollanäytettä, sekoitetaan huolellisesti, annetaan tasoittua 10 minuuttia ja sekoitetaan uudelleen useita kertoja ennen uuttovaiheeseen (5.2) siirtymistä.

Jos saatavilla ei ole näytteen kaltaista nollanäytettä (ks. 5.1.1), voidaan saantokoe suorittaa vaihtoehtoisesti standardinlisäysmenetelmällä. Tällöin analysoitavaan näytteeseen lisätään näytteiden jo sisältämää määrää vastaava määrä lasalosid-natriumia. Tämä näyte analysoidaan yhdessä varsinaisen näytteen kanssa, ja saanto voidaan laskea vähennyslaskulla.

5.2 Uutto

5.2.1 Rehu

Punnitaan 5—10 g näytettä 0,01 g:n tarkkuudella 250 ml:n tulpalliseen erlenmeyerkolviin. Lisätään pipetillä 100,0 ml hapanta metanolia (3.8). Suljetaan tulpalla ja sekoitetaan kunnes näyte on liuennut. Laitetaan kolvi noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäähdytetään huoneenlämpöiseksi. Annetaan laskeutua noin tunnin ajan ja suodatetaan määräosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.2.2 Esiseokset

Punnitaan 2 g jauhamatonta esiseosta 0,001 g:n tarkkuudella 250 ml:n mittapulloon. Lisätään 100,0 ml hapanta metanolia (3.8) ja sekoitetaan kunnes esiseos on liuennut. Laitetaan kolvi sisältöineen noin 40-asteiseen ultraäänihauteeseen (4.1) 20 minuutiksi, otetaan pois ja jäähdytetään huoneenlämpöiseksi. Täytetään merkkiin happamalla metanolilla (3.8) ja sekoitetaan hyvin. Annetaan laskeutua tunnin ajan ja suodatetaan määräosa 0,45 µm:n kalvosuodattimen (4.2) läpi sopivaan astiaan. Laimennetaan sopiva määrä kirkasta suodosta happamalla metanolilla (3.8) siten, että lopullisessa koeliuoksessa on lasalosid-natriumia noin 4 µg/ml. Tehdään HPLC-määritys (5.3).

5.3 HPLC-määritys

5.3.1 Ajo-olosuhteet

Seuraavat ajo-olosuhteet ovat ohjeellisia; ajo voidaan suorittaa muissa olosuhteissa, jos niillä saadaan samat tulokset:

Nestekromatografiakolonni (4.3.1):	125 mm × 4 mm, käänteisfaasi C18, hiukkaskoko 5 µm tai vastaava
Ajoliuos (3.9):	Fosfaattipuskuriliuoksen (3.7) ja metanolin (3.5) seos, 5 + 95 (v + v)
Virtausnopeus:	1,2 ml/min
Mittausaallonpituudet:	
— Eksitaatio:	310 mm
— Emissio:	419 mm
Injektiotilavuus:	20 µl

Kromatografiajärjestelmän stabiilisuus tarkistetaan injektoimalla useita kertoja 4,0 µg/ml:n kalibrointiliuosta (3.10.2), kunnes piikkien korkeudet (tai pinta-alat) ja retentioajat pysyvät vakioina.

5.3.2 Kalibrointikäyrä

Injektoidaan kutakin kalibrointiliuosta (3.10.3) useita kertoja ja lasketaan kutakin konsentraatiota vastaavat piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot. Piirretään kalibrointikäyrä merkiten piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvot x-akselille ja vastaavat konsentraatiot (µg/ml) y-akselille.

5.3.3 Näyteliuos

Injektoidaan 5.2.1 tai 5.2.2 kohdassa saatuja näyteuutteita useita kertoja käyttäen samaa tilavuutta kuin kalibrointiliuoksille ja määritetään lasalosid-natriumpiikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvo.

6. **Tulosten laskeminen**

Näyteliuosta (5.3.3) injektoimalla saatujen piikkien korkeuksien (pinta-alojen) keskiarvosta määritetään lasalosidi-natriumkonsentraatio (µg/ml) kalibrointikäyrän avulla.

6.1 Rehu

Näytteen lasalosid-natriumpitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

jossa:

ß = näyteliuoksen (5.2.1) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml)

V = 5.2.1 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (ts. 100 ml)

m = punnittu näytemäärä (g)

6.2 Esiseokset

Näytteen lasalosid-natriumpitoisuus w (mg/kg) saadaan seuraavasta kaavasta:

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

jossa:

ß = näyteliuoksen (5.2.2) lasalosid-natriumkonsentraatio (µg/ml)

V = 5.2.2 kohdan mukaisesti valmistetun näyteuutteen tilavuus (ts. 250)

f = 5.2.2 kohdan mukainen laimennustekijä

m = punnittu näytemäärä (g)

7. **Tulosten validointi**

7.1 Tunnistettavuuden varmentaminen

Spektrofluorimetriaan perustuvissa menetelmissä on vähemmän häiriömahdollisuuksia kuin UV-mittauksissa. Analyytin tunnistettavuus voidaan varmistaa rinnakkaiskromatografialla.

7.1.1 Rinnakkaiskromatografia

Näyteuutteeseen (5.2.1 tai 5.2.2) lisätään sopiva määrä kalibrointiliuosta (3.10.3). Lisätyn lasalosid-natriummäärän tulisi olla samanlainen kuin näyteliuoksesta määritetty lasalosid-natriummäärä. Ainoastaan lasalosid-natriumpiikin korkeus saisi kasvaa määrällä, joka vastaa lisättyä määrää lasalosid-natriumia ja näyteliuoksen laimennosta. Piikin leveyden tulisi olla puolikokorkeudessa ± 10 % sellaisen näyteliuoksen, johon ei ole lisätty lasalosid-natriumia, piikin leveydestä.

7.2 Toistettavuus

Samasta näytteestä tehdyn kahden rinnakkaisen määrityksen tulosten ero ei saa olla suurempi kuin:

— 15 % lasalosid-natriumpitoisuuden korkeammasta arvosta välillä 30 mg/kg—100 mg/kg,

— 15 mg/kg lasalosid-natriumpitoisuuden ollessa 100 mg/kg—200 mg/kg,

— 7,5 % lasalosid-natriumpitoisuuden korkeammasta arvosta pitoisuuksien ollessa yli 200 mg/kg.

7.3 Saanto

Kun (nolla)näytteeseen on lisätty lasalosid-natriumia, saannon on oltava vähintään 80 %. Kun esiseosnäytteisiin on lisätty lasalosid-natriumia, saannon on oltava vähintään 90 %.

8. **Laboratorioiden välisen vertailun tulokset**

Laboratorioiden [1] välinen vertailu järjestettiin siten, että 2 esiseosta (näytteet 1 ja 2) ja 5 rehua (näytteet 3—7) tutkittiin 12 laboratoriossa. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkaismääritykset. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

[1] Analyst, 1995, 120, 2175–2180

	Näyte 1 Kananrehun esiseos	Näyte 2 Kalkkunan-rehun esiseos	Näyte 3 Kalkkunan-rehupelletit	Näyte 4 Kanan-rehurakeet	Näyte 5 Kalkkunan-rehu	Näyte 6 Siipi-karjan-rehu A	Näyte 7 Siipi-karjan-rehu B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Keskiarvo (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
Nimellis-pitoisuus (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50[+]	35[+]

L = laboratorioiden lukumäärä.
n = yksittäisten tulosten lukumäärä.
s_r = toistettavuuden keskihajonta.
s_R = uusittavuuden keskihajonta.
CV_r = toistettavuuden variaatiokerroin, %.
CV_R = uusittavuuden variaatiokerroin, %.
* = valmistajan ilmoittama pitoisuus.
[+] = laboratoriossa valmistettu rehu.