KOMMISSIONENS DIREKTIV 1999/76/EG

av den 23 juli 1999

om fastställande av gemenskapsmetoder för bestämning av natriumlasalocid i foder

(Text av betydelse för EES)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 70/373/EEG av den 20 juli 1970 om införande av gemenskapsmetoder för provtagning och analys vid den officiella foderkontrollen [1], senast ändrat genom Anslutningsakten för Österrike, Finland och Sverige, särskilt artikel 2 i detta, och

av följande skäl:

1. I direktiv 70/373/EEG föreskrivs att efterlevnaden av lagar och andra författningar som reglerar kvalitet och sammansättning hos foder måste övervakas genom officiella kontroller med användande av gemenskapsmetoder för provtagning och bestämning.

2. I rådets direktiv 70/524/EEG av den 23 november 1970 om fodertillsatser [2], senast ändrat genom kommissionens förordning (EG) nr 866/1999 [3], föreskrivs att halten av natriumlasalocid måste anges genom märkning då detta ämne används som tillsats i förblandningar och foder.

3. Det måste fastställas gemenskapsmetoder för bestämning av detta ämne.

4. De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från Ständiga foderkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Medlemsstaterna skall föreskriva att den officiella kontrollen av lasalocidhalten i foder och förblandningar skall utföras med hjälp av den metod som anges i bilagan till detta direktiv.

Artikel 2

Medlemsstaterna skall senast den 31 januari år 2000 sätta i kraft de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast underrätta kommissionen om detta.

De skall tillämpa bestämmelserna från och med den 1 februari år 2000.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

Artikel 3

Detta direktiv träder i kraft den tjugonde dagen efter det att det har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Artikel 4

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 23 juli 1999.

På kommissionens vägnar

Franz FISCHLER

Ledamot av kommissionen

---

[1] EGT L 170, 3.8.1970, s. 2.
[2] EGT L 270, 14.12.1970, s. 1.
[3] EGT L 108, 27.4.1999, s. 21.

BILAGA

BESTÄMNING AV NATRIUMLASALOCID

Ett natriumsalt av en polyeter-monokarboxylsyra som produceras av *Streptomyces lasaliensis*

1. Syfte och omfattning

Metoden avser bestämning av natriumlasalocid i foder och förblandningar. Detektionsgränsen är 5 mg/kg och bestämningsgränsen 30 mg/kg.

2. Princip

Natriumlasalocid extraheras från provet med hjälp av surgjord metanol och en bestämning görs med reversed phase-vätskekromatografi och en spektrofluorometrisk detektor.

3. Reagens

3.1 Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4)

3.2 Ortofosforsyra, w = 85 %

3.3 Lösning av ortofosforsyra, σ = 20 %

Späd 23.5 ml ortofosforsyra (3.2) med vatten till 100 ml.

3.4 6-metyl-2-heptylamin (1,5-dimetylhexylamin), w = 99 %

3.5 Metanol, HPLC-kvalitet

3.6 Saltsyra, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7 Fosfatbuffertlösning med konc. 0,01 mol/l

Lös 1,36 gram KH_2PO_4 (3.1) i 500 ml vatten (3.11). Tillsätt 3,5 ml ortofosforsyra (3.2) och 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamin (3.4). Ställ pH till 4,0 med ortofosforsyralösningen (3.3) och späd med vatten till 1 000 ml (3.11).

3.8 Surgjord metanol

För över 5,0 ml saltsyra (3.6) till en 1 000 ml mätkolv. Späd till märket med metanol (3.5) och blanda. Lösningen måste vara nyberedd då den används.

3.9 HPLC, mobil fas: lösning av fosfatbuffert och metanol 5 + 95 (V + V)

Blanda 5 ml fosfatbuffertlösning (3.7) med 95 ml metanol (3.5).

3.10 Natriumlasalocid: standardsubstans med garanterad renhet, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (ett natriumsalt av en polyeter-monokarboxylsyra som produceras av *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1 Stamstandardlösning av natriumlasalocid, 500 µg/ml

Väg upp 50 mg natriumlasalocid (3.10) med en noggrannhet av 0,1 mg i en 100 ml mätkolv. Lös natriumlasalociden i lite surgjord metanol (3.8). Späd sedan till märket med samma lösningsmedel och blanda. Lösningen måste vara nyberedd då den används.

3.10.2 Arbetsstandardlösning av natriumlasalocid, 50 µg/ml

Pipettera 10,0 ml stamstandardlösning (3.10.1) till en 100 ml mätkolv. Späd till märket med surgjord metanol (3.8) och blanda. Den erhållna lösningen måste vara nyberedd då den används.

3.10.3 Kalibreringslösningar

För över 1,0 2,0 4,0 5,0 och 10,0 ml av arbetsstandardlösningen (3.10.2) till ett antal 50 ml mätkolvar. Späd till märket med surgjord metanol (3.8) och blanda. De erhållna lösningar innehåller 1,0 2,0 4,0 5,0 respektive 10,0 µg natriumlasalocid per ml. De erhållna lösningarna måste vara nyberedda då de används.

3.11 Vatten, HPLC-kvalitet

4. **Apparatur**

4.1 Termostatreglerat ultraljudsbad (eller skakapparat med vattenbad)

4.2 Membranfilter: 0,45 µm

4.3 HPLC-utrustning med injektor som är anpassad för volymer på 20 µl

4.3.1 Vätskekromatografisk kolonn 125 × 4 mm av typen reversed-phase C18, 5 µm packning eller motsvarande

4.3.2 Spektrofluorometer med reglerbar exciterings- och emissionsvåglängd

5. **Utförande**

5.1 Allmänt

5.1.1 Blindprov

Före utbytestestet (5.1.2) analyseras ett blindprov för att kontrollera att varken natriumlasalocid eller något annat störande ämne är närvarande. Blindprovet bör vara av liknande typ som provet och varken natriumlasalocid eller andra störande ämnen skall kunna påvisas i det.

5.1.2 Utbytestest

Ett utbytestest görs genom analys av det blindprov som har ”spikats” genom tillsats av ungefär så mycket natriumlasalocid som finns i provet. För att halten av natriumlasalocid skall bli 100 mg/kg förs 10,0 ml av stamstandardlösningen (3.10.1) över till en 250 ml e-kolv och får avdunsta till dess att ca 0,5 ml återstår. Tillsätt 50 gram av blindprovet, blanda omsorgsfullt och låt stå i 10 minuter. Blanda upprepade gånger innan extraktionen påbörjas (5.2).

Om ett blindprov av liknande typ som provet inte finns att tillgå (se 5.1.1) kan ett utbytestest göras genom en standardiserad additionsmetod. Det prov som skall analyseras spikas då med ungefär så mycket natriumlasalocid som det redan innehåller. Det erhållna provet analyseras sedan tillsammans med ett prov som inte spikats, och utbytet beräknas genom subtraktion.

5.2 Extraktion

5.2.1 Foder

Väg upp mellan 5 och 10 gram av provet med en noggrannhet av 0,01 gram i en 250 ml e-kolv med propp. Tillsätt 100,0 ml surgjord metanol (3.8) med en pipett. Sätt i proppen löst och snurra kolven till dess att provet har lösts. Sätt kolven i ett ca 40 °C ultraljudsbad (4.1) i 20 minuter. Tag upp kolven ur badet och låt den svalna till rumstemperatur. Låt stå i ca 1 timme så att de suspenderade partiklarna sjunker till botten. Filtrera en del av lösningen genom ett 0,45 µm membranfilter (4.2) till ett lämpligt kärl. Gå vidare till HPLC-bestämningen (5.3).

5.2.2 Förblandningar

Väg upp ca 2 gram av den ej finfördelade förblandningen, med en noggrannhet av 0,001 gram, i en 250 ml mätkolv. Tillsätt 100,0 ml surgjord metanol (3.8) och snurra kolven till dess att provet lösts. Sätt kolven i ett ca 40 °C ultraljudsbad (4.1) i 20 minuter. Tag upp kolven ur badet och låt den svalna till rumstemperatur. Späd till märket med surgjord metanol (3.8) och blanda omsorgsfullt. Låt stå i 1 timme så att de suspenderade partiklarna sjunker till botten. Filtrera en del av lösningen genom ett 0,45 µm membranfilter (4.2). Späd en lämplig volym av det klarnade filtratet med surgjord metanol (3.8) så att en slutlig provlösning erhålls som innehåller ca 4 µg natriumlasalocid/ml. Gå vidare till HPLC-bestämningen (5.3).

5.3 HPLC-bestämning

5.3.1 Parametrar

Följande värden anges som en vägledning. Andra värden kan väljas om de ger motsvarande resultat.

Vätskekromatografisk kolonn (4.3.1):	125 mm × 4 mm, av typen reversed-phase C18, 5 µm packning eller motsvarande
Mobil fas (3.9):	Blandning av fosfatbufferlösning (3.7) och metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Flöde:	1,2 ml/min
Detektionsvåglängder:	
— Excitering:	310 mm
— Emission:	419 mm
Injektionsvolym:	20 µl

Kontrollera att det kromatografiska systemet är stabilt genom att upprepade gånger injicera kalibreringslösningen (3.10.3) med koncentrationen 4,0 µg/ml till dess att retentionstiderna samt topparnas höjd (eller area) är konstant.

5.3.2 Kalibreringskurva

Injicera varje kalibreringslösning (3.10.3) upprepade gånger och bestäm medeltopphöjden (arean) för varje koncentration. Konstruera en kalibreringskurva med kalibreringslösningarnas medeltopphöjder (areor) längs y-axeln och motsvarande koncentrationer i µg/ml längs x-axeln.

5.3.3 Provlösning

Injicera upprepade gånger de provlösningar som erhållits i 5.2.1 eller 5.2.2. Använd samma volym som för kalibreringslösningen. Bestäm medelhöjden (medelarean) för de natriumlasalocidtoppar som erhålls.

6. **Beräkning av resultat**

Bestäm koncentrationen natriumlasalocid (µg/ml) genom att jämföra medelhöjden (medelarean) hos de toppar som erhållits vid injektion av provlösningen (5.3.3) med kalibreringskurvan.

6.1 Foder

Halten natriumlasalocid, w (mg/kg) i provet beräknas med följande formel:

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

där

ß = halten av natriumlasalocid i provlösningen i µg/ml (5.2.1)

V_1 = provlösningens volym i ml (= 100), se 5.2.1

m = provets massa i gram

6.2 Förblandningar

Halten av natriumlasalocid, w (mg/kg) i provet beräknas med följande formel:

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

där

ß = halten av natriumlasalocid i provlösningen i µg/ml (se 5.2.2)

V_2 = provlösningens volym i ml (= 250), se 5.2.2

f = spädningsfaktor, se 5.2.2

m = provets massa i gram

7. **Utvärdering av resultat**

7.1 Identitet

Metoder som grundar sig på spektrofluorometri medför inte samma problem med störningar (interferenser) som metoder med UV-detektion. Analytens identitet kan fastställas genom co-kromatografi.

7.1.1 Co-kromatografi

En provlösning (5.2.1 eller 5.2.2) spikas genom tillsats av en lämplig mängd kalibreringslösning (3.10.3). Mängden tillsatt natriumlasalocid bör vara ungefär lika stor som den ursprungliga mängden natriumlasalocid i provlösningen. Bara höjden på natriumlasalocidtoppen bör öka beroende på mängden tillsatt natriumlasalocid och provlösningens spädning. Toppens bredd på mitten får inte avvika med mer än 10 % (uppåt eller nedåt) från värdet för den ursprungliga topp som motsvarar den icke spikade provlösningen.

7.2 Repeterbarhet

Skillnaden mellan resultaten från två parallella bestämningar som utförts på samma prov får inte avvika med mer än

— 15 %, beräknat från det högre värdet, för halter av natriumlasalocid på mellan 30 och 100 mg/kg,

— 15 mg/kg, för halter på mellan 100 och 200 mg/kg, och

— 7,5 %, beräknat från det högre värdet, för halter som överstiger 200 mg/kg.

7.3 Utbyte

Utbytet för det spikade blindprovet måste vara åtminstone 80 %, och för det spikade provet från förblandningen åtminstone 90 %.

8. **Resultat från provningsjämförelsen**

En provningsjämförelse [1] gjordes där två förblandningar (prov 1 och 2) samt fem fodertyper (prov 3–7) analyserades av sammanlagt tolv laboratorier. Varje prov analyserades två gånger. Resultaten anges i tabellen nedan.

[1] Analyst, 1995, 120, s. 2175–2180.

	Prov 1 Förblandning för kyckling	Prov 2 Förblandning för kalkon	Prov 3 Pelletar för kalkon	Prov 4 Foder i smulform för kyckling	Prov 5 Foder för kalkon	Prov 6 Foder A för fjäderfä	Prov 7 Foder B för fjäderfä
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Medelvärde (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
Nominell halt (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50[+]	35[+]

L = antal laboratorier.
n = antal enskilda resultat.
s_r = standardavvikelse för repeterbarheten.
S_R = standardavvikelse för reproducerbarheten.
CV_r = variationskoefficient för repeterbarheten (%).
CV_R = variationskoefficient för reproducerbarheten (%).
* innehåll enligt tillverkaren.
[+] foder som beretts i laboratoriet.