31999L0076

SMĚRNICE KOMISE 1999/76/ES

ze dne 23. července 1999,

kterou se stanoví analytická metoda Společenství pro stanovení lasalocidu sodného v krmivech

(Text s významem pro EHP)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod pro úřední kontrolu krmiv, ([1]) naposledy pozměněnou aktem o přistoupení Rakouska, Finska a Švédska, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Směrnice 70/373/EHS stanoví, že úřední kontroly krmiv za účelem prověření toho, zda splňují požadavky stanovené právními a správními předpisy týkajícími se jejich jakosti a složení, se provádí za použití metod Společenství pro odběr vzorků a analýz.

(2) Směrnice Rady 70/524/EHS ze dne 23. listopadu 1970 o doplňkových látkách v krmivech ([2]), naposledy pozměněná nařízením Komise (ES) č. 866/1999 ([3]), stanoví, aby obsah lasalocidu sodného musí být uveden na etiketě, pokud jsou tyto látky přidány do premixů a krmiv.

(3) Musí být stanoveny analytické metody Společenství pro kontrolu těchto látek.

(4) Opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu obsahu lasalocidu sodného v krmivech a premixech se provádějí za použití metod uvedených v příloze této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. ledna 2000. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Budou tyto předpisy používat od 1. února 2000.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 3

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Článek 4

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 23. července 1999.

Za Komisi

Franz FISCHLER

člen Komise

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

PŘÍLOHA

STANOVENÍ LASALOCIDU SODNÉHO

Sodná sůl polyetheru monokarboxylové kyseliny produkované *Streptomyces lasaliensis*

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda slouží ke stanovení lasalocidu sodného v krmivech a premixech. Hranice detekce je 5 mg/kg, hranice stanovení 30 mg/kg.

2. **Princip**

Lasalocid sodný je extrahován ze vzorku do okyseleného methanolu a stanoven vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na obrácené fázi za využití spektrofluorometrického detektoru.

3. **Činidla**

3.1 Fosrorečnan dihydrogendraselný (KH_2PO_4)

3.2 Kyselina orthofosforečná, w = 85 %

3.3 Kyselina orthofosforečná ředěná, ρ= 20 %

Rozpustit 23,5 ml kyseliny ortofosforečné (3.2.) ve 100 ml vody

3.4 6-methyl-2-heptylamin (1,5-dimethylhexylamin), w = 99 %

3.5 Methanol, HPLC čistota

3.6 Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.7 Roztok fosfátového pufru, c = 0,01 mol/l

Rozpustit 1.36 g KH_2PO_4 (3.1) v 500 ml vody (3.11), přidat 3,5 ml kyseliny ortofosforečné (3.2) a 10,0 ml 6-methyl-2-heptylaminu (3.4). Pomocí roztoku kyseliny ortofosforečné (3.3) nastavit pH na 4,0 a rozředit do 1 000 ml vodou (3.11).

3.8 Okyselený methanol

Do odměrné Elenmayerovy baňky o objemu 1 000 ml přenést 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6), doplnit po značku methanolem (3.5) a promíchat. Tento roztok by měl být připravován čerstvě bezprostředně před použitím.

3.9 HPLC mobilní fáze, roztok fosfátového pufru a methanolu 5 + 95 (obj. + obj.)

Promíchat 5 ml roztoku fosfátového pufru (3.7) s 95 ml mehtanolu (3.5).

3.10 Standardní lacalocid sodný se zaručenou čistotou, $C_{34}H_{53}O_8$ (sodná sůl polyetheru monokarboxylové kyseliny produkované *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1 Zásobní roztok lasalocidu sodného, 500 g/ml

S přesností 0,1 mg navážit 50 mg lasalocidu sodného (3.10.) do 100 mililitrové odměrné Elenmayerovy baňky, rozpustit v okyseleném methanolu (3.8.), doplnit po značku stejným rozpouštědlem a promíchat. Tento roztok by měl být připravován čerstvě bezprostředně před použitím.

3.10.2 Střední roztok lacalocidu sodného, 50 g/ml

Nabrat pipetou 10,0 ml zásobního roztoku (3.10.1.) do odměrné Elenmayerovy baňky o objemu 100 ml, doplnit po značku okyseleným methanolem (3.8.) a promíchat. Tento roztok by měl být připravován čerstvě bezprostředně před použitím.

3.10.3 Kalibrační roztoky

Do sady odměrných Elenmayerových baněk o objemu 50 ml odměřit 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 ml středního roztoku lacalocidu sodného (3.10.2). Doplnit po značku okyseleným methanolem (3.8) a promíchat. Tyto roztoky odpovídají 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 mikrogramům lacalocidu sodného na ml. Všechny by měly být připravovány čerstvě bezprostředně před použitím.

3.11 Voda, HPLC čistota

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 Ultrasonická lázeň (nebo protřepávací vodní lázeň) s možností regulace teploty

4.2 Membránové filtry, 0,45 μm

4.3 HPLC aparatura s injekčním systémem schopným pojmout objem 20 μl

4.3.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii 125 mm x 4 mm, reverzní fáze C18, 5 μm nebo ekvivalentní balení

4.3.2 Spektrofluorimetr s možností nastavení excitační i emisní vlnové délky

5. **Postup**

5.1 Obecné

5.1.1 Slepý pokus

Před provedením kontrolního testu (5.1.2) je potřeba nejprve analyzovat čisté krmivo a prověřit, zda neobsahuje lasalocid sodný ani jiné interferující látky. Toto krmivo musí být podobného typu jako testovaný vzorek a nesmí v něm být detekován lasalocid sodný ani jiné interferující substance.

5.1.2 Kontrolní test

Při kontrolním testu by měla být provedena analýza čistého krmiva, obohaceného přidáním lasalocidu sodného v množství přibližně shodném s jeho obsahem ve vzorku. Pro dosažení obohacení na úroveň 100 mg/kg, nalít 10,0 ml zásobního roztoku (3.10.1) do 250 ml kónické kádinky a odpařit roztok na přibližně 0,5 ml. Přidat 50 g čistého krmiva, důkladně promíchat a ponechat v klidu 10 minut. Před pokračováním s extrakcí (5.2) opět několikrát promíchat.

Jinou možností, pokud není k dispozici čisté krmivo podobné vzorku (viz 5.1.1.), je provedení kontrolního testu metodou standardní adice. V tomto případě je analyzovaný vzorek obohacen o lasalocid sodný, jehož množství by mělo přibližně odpovídat obsahu lasalocidu, který je ve vzorku již přítomen. Tento vzorek se analyzuje společně s neobohacaeným a kontrola je provedena odečtením.

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva

Navážit 5 až 10 g vzorku s přesností 0,01 g do 250 ml Elenmayerovy baňky se zátkou. Pipetou přidat 100,0 ml okyseleného methanolu (3.8). Volně zazátkovat a krouživými pohyby rozmíchat. Umístit kádinku s obsahem do ultrasonické lázně (4.1) o teplotě přibližně 40 °C na 20 minut. Poté vyjmout a ochladit na pokojovou teplotu. Nechat stát po dobu zhruba jedné hodiny, dokud nedojde k usazení rozpuštěné látky. Poté odfiltrovat kapalnou část přes 0,45 m membránový filtr (4.2) do vhodné nádoby. Přejít k určování pomocí HPLC (5.3.).

5.2.2 Premixy

Odvážit s přesností 0,001 g zhruba nerozemletého 2 g premixu do 250 mililitrové odměrné baňky. Přidat 100,0 ml okyseleného methanolu (3.8) a krouživým pohybem rozmíchat. Umístit kádinku s obsahem do ultrasonické lázně (4.1) o teplotě přibližně 40 °C na 20 minut. Poté vyjmout a ochladit na pokojovou teplotu. Doplnit po značku okyseleným methanolem (3.8) a důkladně promíchat. Nechat stát po dobu jedné hodiny, dokud se rozpuštěná hmota neusadí. Poté odfiltrovat kapalnou část přes 0,45 m membránový filtr (4.2) do vhodné nádoby. Naředit vhodný objem čistého filtrátu okyseleným methanolem (3.8), aby se získal finální testovací roztok obsahující kolem 4 g/ml lasalocidu sodného. Přejít k určování pomocí HPLC (5.3).

5.3 Stanovení pomocí HPLC

5.3.1 Parametry

Následující podmínky jsou uvedeny pro orientaci; je možno použít jiné, pokud dávají rovnocenné výsledky:

Kapalná chromatografická kolona (4.3.1):	125 mm x 4 mm, obrácená fáze C18, balení 5 m nebo ekvivalentní
Mobilní fáze (3.9):	Směs fosfátového pufru (3.7) a methanolu (3.5), 5 + 95 (obj. + obj.)
Rychlost průtoku:	1,2 ml/min
Detekční vlnové délky:	
– Excitační:	310 nm
– Emisní:	419 nm
Injektovaný objem:	20 μl

Prověřit stabilitu chromatografického systému opakovanou injekcí kalibračního roztoku (3.10.3), dokud nedojde k dosažení konstantních výšek (nebo ploch) a retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační graf

Injektovat několikrát každý kalibrační roztok (3.10.3) a určit střední hodnotu výšky (plochy) pro každou koncentraci. Nakreslit kalibrační graf se středními hodnotami výšek (ploch) na vodorovné ose a odpovídajícími koncentracemi v µg/ml na ose svislé.

5.3.3 Roztok se vzorkem

Několikrát injektovat roztok se vzorkem získaný v 5.2.1 nebo 5.2.2 za použití stejného objemu jako v případě kalibračních roztoků a určit střední hodnotu výšky (plochy) odpovídající lasalocidu sodnému.

6. Výpočet výsledků

Ze středních hodnot výšek (ploch) vytvořených injekcí roztoku se vzorkem (5.3.3) určit koncentraci lasalocidu sodného (g/ml) srovnáním s kalibračním grafem.

6.1 Krmiva

Obsah lasalocidu sodného ve vzorku, w (mg/kg) je dán následujícím vztahem

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

kde:

β = koncentrace lasalocidu sodného v roztoku vzorku (5.2.1) v µg/ml,

V_1 = V2 = objem extraktu vzorku podle 5.2.1. v ml (tj. 100),

m = hmotnost testovaného podílu v g.

6.2 Premixy

Obsah lasalocidu sodného ve vzorku, w (mg/kg) je dán následujícím vztahem

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

kde:

β = koncentrace lasalocidu sodného v roztoku vzorku (5.2.2.) v g/ml,

V_2 = objem extraktu vzorku podle 5.2.2. v ml (t. j. 250),

f = faktor naředění podle 5.2.2., m = hmotnost testovaného podílu v g.

7. Ověření výsledků

7.1 Shodnost

Metody založené na spektrofluorometrii jsou méně náchylné k interferencím ve srovnání s postupy založenými na detekci UV záření. Identitu analyzovaného materiálu lze potvrdit kochromatografií.

7.1.1 Kochromatografie

Testovaný extrakt (5.2.1 nebo 5.2.2) je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (3.10.3). Množství přidaného lasalocidu sodného by mělo být podobné množství, které bylo nalezeno v testovaném extraktu. V míře odpovídající množství přidaného lasalocidu a naředění vzorku by měla být zvýšena pouze výška odpovídající lasalocidu sodnému. Jeho položířka se nesmí odchylovat o více než od položířky vytvořené neobohaceným extraktem vzorku.

7.2 Reprodukovatelnost

Rozdíly mezi výsledky dvou paralelních určování provedených se stejným vzorkem nesmí překročit:

— 15 % vztažených relativně k vyšší hodnotě pro obsah lasalocidu sodného v rozmezí od 30 mg/kg do 100 mg/kg,

— 15 mg/kg pro obsah lasalocidu sodného v rozmezí od 100 mg/kg do 200 mg/kg,

— 7,5 % vztažených relativně k vyšší hodnotě pro obsah lasalocidu sodného vyšší než 200 mg/kg.

7.3 Výtěžnost

Výtěžnost by měla být alespoň 80 % pro obohacený (čistý) vzorek. Pro obohacené vzorky premixů by výtěžek měl dosahovat alespoň 90 %.

8. Výsledky společné studie

Ve společné studii [1] byly ve 12 laboratořích analyzovány 2 premixy (vzorek 1 a 2) a 5 krmiv (vzorky 3-7). Na každém vzorku byly provedeny dvě analýzy. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

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

	Vzorek 1 Kuřecí premix	Vzorek 2 Krůtí premix	Vzorek 3 Krůtí granule	Vzorek 4 Kuřecí droby	Vzorek 5 Krůtí krmivo	Vzorek 6 Drůbeží krmivo A	Vzorek 7 Drůbeží krmivo B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Střední hodnota (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
Nominální obsah (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (+)	35 (+)

L = počet laboratoří

N = počet jednotlivých výsledků

Sr = standardní odchylka při opakování

SR = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CVr = variační koeficient při opakování, %

CVR = variační koeficient reprodukovatelnosti, %

(*) podle údajů výrobce

(+) krmivo připraveno v laboratoři