31999L0076

KOMISIJAS DIREKTĪVA 1999/76/EK

(1999. gada 23. jūlijs),

ar ko nosaka Kopienas analīzes metodi lazalocīdnātrija noteikšanai barībā

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1970. gada 20. jūlija Direktīvu 70/373/EEK par paraugu ņemšanas un analīžu Kopienas metožu ieviešanu barības oficiālajai kontrolei [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Austrijas, Somijas un Zviedrijas Pievienošanās aktu, un jo īpaši tās 2. pantu,

(1) tā kā Direktīva 70/373/EEK izvirza noteikumu, ka, lai pārbaudītu, vai lopbarība atbilst prasībām, kas izriet no normatīviem un administratīviem aktiem, kuri reglamentē tās kvalitāti un sastāvu, oficiālā kontrole jāveic, izmantojot Kopienas paraugu ņemšanas un analīžu metodes;

(2) tā kā Padomes 1970. gada 23. novembra Direktīvā 70/524/EEK par barības piedevām [2], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Komisijas 1999. gada 26. aprīļa Regulu (EK) Nr. 866/1999 [3], noteikts, ka gadījumā, ja lazalocīdnātriju pievieno premiksiem un barībai, šīs vielas saturam jābūt norādītam attiecīgajā marķējumā;

(3) tā kā jānosaka Kopienas analīžu metodes šo vielu noteikšanai;

(4) tā kā šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Barības pastāvīgās komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Dalībvalstis nosaka, ka lazalocīdnātrija satura analīzes lopbarības un premiksu oficiālajai kontrolei veic saskaņā ar šīs direktīvas pielikumā aprakstītajām metodēm.

2. pants

Ne vēlāk kā 2000. gada 31. janvārī dalībvalstīs stājas spēkā normatīvi un administratīvi akti, kas nepieciešami, lai izpildītu šīs direktīvas prasības. Dalībvalstis par to tūlīt informē Komisiju.

Dalībvalstis piemēro šos pasākumus no 2000. gada 1. februāra.

Kad dalībvalstis pieņem minētos pasākumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka šādu atsauču izdarīšanas kārtību.

3. pants

Šī direktīva stājas spēkā divdesmitajā dienā pēc publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1999. gada 23. jūlijā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Franz FISCHLER

[1] OV L 170, 3.8.1970., 2. lpp.
[2] OV L 270, 14.12.1970., 1. lpp.
[3] OV L 108, 27.4.1999., 20. lpp.

PIELIKUMS

LAZALOCĪDNĀTRIJA NOTEIKŠANA

Poliētera monokarbonskābes nātrija sāls, kuru ražo *Streptomyces lasaliensis*

1. **Mērķis un piemērošanas joma**

Metode paredzēta lazalocīdnātrija noteikšanai lopbarībā un premiksos. Metodes mazākā nosakāmā koncentrācija ir 5 mg/kg, kvantitatīvās noteikšanas robeža – 0,5 mg/kg.

2. **Princips**

Lazalocīdnātriju no parauga ekstrahē ar paskābinātu metanolu un nosaka ar apgrieztās fāzes augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfiju (HPLC), izmantojot fluorescences detektoru.

3. **Reaģenti**

3.1. Kālija dihidrogēnfosfāts, KH2PO4.

3.2. Ortofosforskābe, w = 85 %.

3.3. Ortofosforskābes šķīdums, σ = 20 %.

Atšķaida 23,5 ml ortofosforskābes (3.2. punkts) ar ūdeni līdz 100 ml tilpumam.

3.4. 6-metil-2-heptilamīns (1,5-dimetilheksilamīns), w = 99 %.

3.5. Metanols, HPLC tīrības pakāpē.

3.6. Sālsskābe, ρ20 = 1,19 g/ml.

3.7. Fosfāta buferšķīdums, c = 0,01 mol/l.

Izšķīdina 1,36 g KH2PO4 (3.1. punkts) 500 ml ūdens (3.11. punkts), pievieno 3,5 ml ortofosforskābes (3.2. punkts) un 10,0 ml 6-metil-2-heptilamīna (3.4. punkts). Noregulē pH līdz 4,0 ar ortofosforskābes šķīdumu (3.3. punkts) un atšķaida ar ūdeni (3.11. punkts) līdz 1000 ml tilpumam.

3.8. Paskābināts metanols.

Iepilda 5,0 ml sālsskābes (3.6. punkts) 1 000 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar metanolu (3.5. punkts) un sajauc. Šis šķīdums jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.9. HPLC kustīgā fāze, fosfāta bufera-metanola šķīdums 5 + 95 (V + V).

Samaisa 5 ml fosfāta buferšķīduma (3.7. punkts) ar 95 ml metanola (3.5. punkts).

3.10. Lazalocīdnātrija standartviela ar garantētu tīrību, C34H53O8Na (poliētera monokarbonskābes nātrija sāls, kuru ražo *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Lazalocīdnātrija rezerves standartšķīdums, 500 µg/ml.

Iesver 50 mg lazalocīdnātrija (3.10. punkts) ar precizitāti 0,1 mg 100 ml mērkolbā, izšķīdina paskābinātā metanolā (3.8. punkts), ar to pašu šķīdinātāju uzpilda līdz zīmei un sajauc. Šis šķīdums jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.10.2. Lazalocīdnātrija standartšķīdums, 50 µg/ml.

Ar pipeti 10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts) pārnes 100 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar paskābinātu metanolu (3.8. punkts) un sajauc. Šis šķīdums jāgatavo tieši pirms lietošanas.

3.10.3. Kalibrēšanas šķīdumi.

Iepilda 50 ml kalibrētās kolbās attiecīgi 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 un 10,0 ml standartšķīduma (3.10.2. punkts). Uzpilda līdz zīmei ar paskābinātu metanolu (3.8. punkts) un sajauc. Šo šķīdumu mililitrā ir attiecīgi 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 un 10,0 ml µg lazalocīdnātrija. Šie šķīdumi jāsagatavo tieši pirms lietošanas.

3.11. HPLC tīrības pakāpes ūdens.

4. **Aparatūra**

4.1. Ultraskaņas vanna (vai vibrējoša ūdens vanna) ar temperatūras kontroli.

4.2. Membrānas filtri, 0,45 µm.

4.3. HPLC iekārta ar ievadīšanas sistēmu, piemērota 20 µm tilpuma ievadīšanai.

4.3.1. Šķidrumu hromatogrāfa kolonna, 125 mm × 4 mm, apgrieztā fāze C18, 5 µm pildījums vai līdzvērtīgs.

4.3.2. Spektrofluorimetrs ar maināmu ierosas un emisijas viļņu viļņa garumu.

5. **Kārtība**

5.1. Vispārīgas piezīmes.

5.1.1. Tukšais paraugs.

Veicot atpazīšanas testu (5.1.2. punkts), jāanalizē tukšais paraugs, lai pārbaudītu, vai paraugā nav lazalocīdnātrija vai traucējošu vielu. Tukšajam paraugam jābūt līdzīgam analizējamajam paraugam pēc veida, un nav jākonstatē lazalocīdnātrijs vai traucējošas vielas.

5.1.2. Atpazīšanas tests.

Atpazīšanas testu veic, izmantojot tukšo paraugu, kas pastiprināts ar lazalocīdnātriju, kura daudzums ir līdzīgs analizējamajā paraugā esošajam lazalocīdnātrija daudzumam. Lai paraugu pastiprinātu līdz 100 mg/kg, koniskā 250 ml tilpuma kolbā pārnes 10,0 ml rezerves standartšķīduma (3.10.1. punkts), un to ietvaicē līdz apmēram 0,5 ml. Pievieno 50 g tukšā parauga, rūpīgi sajauc un pirms ekstrakcijas posma (5.2. punkts) atstāj uz 10 minūtēm, vairākas reizes sajaucot.

Ja nav analizējamajam paraugam līdzīga tukšā parauga (sk. 5.1.1. punktu), atpazīšanas testu var veikt pēc standarta piedevu metodes. Šādā gadījumā analizējamo paraugu pastiprina ar lazalocīdnātrija daudzumu, kas ir līdzīgs analizējamajā paraugā jau esošajam daudzumam. Šo paraugu analizē kopā ar nepastiprinātu paraugu, un atpazīšanu aprēķina pēc starpības.

5.2. Ekstrakcija.

5.2.1. Lopbarība.

Iesver no 5 g līdz 10 g parauga ar precizitāti 0,01 g 250 ml koniskā kolbā ar aizbāzni. Ar pipeti pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.8. punkts). Vaļīgi aizkorķē un sakrata, lai disperģējas. Kolbu uz 20 minūtēm ieliek ultraskaņas vannā (4.1. punkts) aptuveni 40 °C temperatūrā, tad izņem un atdzesē līdz istabas temperatūrai. Ļauj nostāties apmēram 1 stundu, kamēr suspendētā viela nogulsnējas, tad kārtnīgo daļu filtrē caur 0,45 µm membrānas filtru (4.2. punkts) piemērotā traukā. Nosaka ar HPLC (5.3. punkts).

5.2.2. Premiksi.

Iesver 2 g nesamalta premiksa ar precizitāti 0,001 g 250 ml mērkolbā. Ar pipeti pievieno 100,0 ml paskābināta metanola (3.8. punkts) un sakrata, lai disperģējas. Kolbu uz 20 minūtēm ieliek ultraskaņas vannā (4.1. punkts) aptuveni 40 °C temperatūrā, tad izņem un atdzesē līdz istabas temperatūrai. Atšķaida līdz zīmei ar paskābinātu metanolu (3.8. punkts) un rūpīgi samaisa. Ļauj nostāties apmēram 1 stundu, kamēr suspendētā viela nogulsnējas, tad filtrē kārtnīgo daļu caur 0,45 µm membrānas filtru (4.2. punkts). Atšķaida piemērotu tilpumu tīra filtrāta ar paskābinātu metanolu (3.8. punkts), izveidojot galīgā testa šķīdumu, kas satur apmēram 4 µg/ml lazalocīdnātrija. Nosaka ar HPLC (5.3. punkts).

5.3. HPLC noteikšana.

5.3.1. Parametri.

Ieteicams ievērot šādus nosacījumus; var izmantot citus nosacījumus, ja tie nodrošina līdzvērtīgus rezultātus.

Šķidrumu hromatogrāfa kolonna (4.3.1. punkts)	125 mm × 4 mm, apgrieztā fāze C18, 5 µm pildījums vai līdzvērtīgs
Kustīgā fāze (3.9. punkts)	Fosfāta buferšķīduma (3.7. punkts) un metanola maisījums (3.5. punkts), 5 + 95 (V + V)
Tecēšanas ātrums	1,2 ml/min
Viļņa garuma noteikšana:	
– Ierosināšana	10 nm
– Emisija	419 nm
Ievadītais tilpums	20 µl

Pārbauda hromatogrāfiskās sistēmas stabilitāti, vairākas reizes ievadot kalibrēšanas šķīdumu (3.10.3. punkts) ar koncentrāciju 4,0 µg/ml, līdz sasniedz nemainīgus pīķa augstumus (vai laukumus) un izdalīšanas laiku.

5.3.2. Kalibrēšanas grafiks.

Katru kalibrēšanas šķīdumu (3.10.3. punkts) ievada vairākas reizes un nosaka katrai koncentrācijai atbilstošo vidējo pīķa augstumu (vai laukumu). Konstruē kalibrēšanas līkni, uz ordinātu ass atzīmējot kalibrēšanas šķīdumu pīķu vidējos augstumus (vai laukumus), un uz abscisu ass – attiecīgās koncentrācijas µg/ml.

5.3.3. Parauga šķīdums.

Iešļircina parauga ekstraktu (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) vairākas reizes, ņemot to pašu tilpumu, kāds bija kalibrēšanas šķīdumiem, un nosaka lazalocīdnātrija pīķa vidējo augstumu (laukumu).

6. **Rezultātu aprēķināšana**

Lazalocīdnātrija šķīduma koncentrāciju (µg/ml) nosaka pēc parauga šķīduma (5.3.3. punkts) pīķu vidējā augstuma (laukuma), salīdzinot ar kalibrēšanas grafiku.

6.1. Lopbarība.

Lazalocīdnātrija saturu paraugā, w (mg/kg) aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur

ß = lazalocīdnātrija koncentrācija parauga šķīdumā (5.2.1. punkts) µg/ml,

V1 = saskaņā ar 5.2.1. punktu iegūtā parauga ekstrakta tilpums ml (t.i., 100),

m = analizējamā parauga masa gramos.

6.2. Premiksi.

Lazalocīdnātrija saturu paraugā, w (mg/kg) aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur

ß = lazalocīdnātrija koncentrācija parauga šķīdumā (5.2.2. punkts) µg/ml,

V2 = saskaņā ar 5.2.2. punktu iegūtā parauga ekstrakta tilpums ml (t.i., 250),

f = atšķaidījuma pakāpe atbilstīgi 5.2.2. punktam,

m = testa daļas masa gramos.

7. **Rezultātu izvērtējums**

7.1. Identitāte.

Metodes, kuru pamatā ir spektrofluorimetrija, interference ietekmē mazāk nekā tās, kur izmanto UV staru detektoru. Analizējamās vielas identitāti var apstiprināt ar paralēlu hromatogrāfisko analīzi.

7.1.1. Paralēla hromatogrāfiskā analīze.

Parauga ekstraktu (5.2.1. vai 5.2.2. punkts) pastiprina, pievienojot attiecīgu daudzumu kalibrēšanas šķīduma (3.10.3. punkts). Pievienotā lazalocīdnātrija daudzumam jābūt vienādam ar parauga ekstraktā noteikto lazalocīdnātrija daudzumu. Tikai lazalocīdnātrija pīķa augstums būtu jāpalielina, ņemot vērā pievienoto lazalocīdnātrija daudzumu un ekstrakta atšķaidījumu. Pīķa platumam, tā augstuma pusē, jābūt ± 10 % no sākotnēji nepastiprināta parauga ekstrakta pīķa platuma, tā augstuma pusē.

7.2. Atkārtojamība.

No viena parauga divās paralēlās noteikšanās iegūto rezultātu atšķirība nedrīkst pārsniegt:

— 15 % no lielākās noteiktās vērtības, ja lazalocīdnātrija saturs ir no 30 mg/kg līdz 100 mg/kg;

— 15 mg/kg – ja lazalocīdnātrija saturs ir no 100 mg/kg līdz 200 mg/kg;

— 7,5 % no lielākās noteiktās vērtības, ja lazalocīdnātrija saturs pārsniedz 200 mg/kg.

7.3. Atpazīšana.

Stiprināta tukšā parauga atpazīšanai vajadzētu būt vismaz 80 %. Stiprināta premiksa paraugu atpazīšanai vajadzētu būt vismaz 90 %.

8. **Salīdzinoša pētījuma rezultāti**

Tika sarīkota salīdzinošā testēšana, 12 laboratorijās analizējot 2 premiksus (1. un 2. paraugs) un 5 lopbarības paraugus (3. līdz 7. paraugs). Visus paraugus analizēja divas reizes. Rezultāti apkopoti tabulā.

	1. paraugs Cāļu barības premikss	2. paraugs Tītaru barības premikss	3. paraugs Granulas tītariem	4. paraugs Rauši cāļiem	5. paraugs Tītaru barība	6. paraugs Mājputnu barība A	7. paraugs Mājputnu barība B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Vidējais saturs (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
Sr (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
Cvr (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
SR (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CVR (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nominālais saturs (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (+)	35 (+)

L = laboratoriju skaits

N = iegûto rezultâtu skaits

Sr = atpazîðanas vidçjâ kvadrâtiskâ novirze

SR = reproducçjamîbas vidçjâ kvadrâtiskâ novirze

CVr = atpazîðanas variâciju koeficients, %

CVR = reproducçjamîbas variâciju koeficients, %

(*) ražotāja deklarētais saturs

(+) laboratorijā sagatavota barība