31999L0076

SMERNICA KOMISIE 1999/76/ES

z 23. júla 1999

stanovujúca analytickú metódu spoločenstva pre stanovenie lasalocidu sodného v krmivách

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady č. 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód spoločenstva pre odber vzoriek a analýzu na účely úradnej kontroly krmív [1], naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení Rakúska, Fínska a Švédska, a najmä jej článok 2,

(1) keďže smernica č. 70/373/EHS stanovuje, že úradné kontroly krmív s cieľom kontroly dodržania požiadaviek na ich kvalitu a zloženie uložených zákonmi, inými právnymi predpismi a administratívnymi opatreniami, sa musia vykonávať metódami spoločenstva pre odber vzoriek a analýzu;

(2) keďže smernica Rady č. 70/524/EHS z 23. novembra 1970, ktorá sa týka prímesí v krmivách [2], naposledy zmenená a doplnená nariadením Komisie (ES) č. 866/1999 z 26. apríla 1999 [3], stanovuje, že obsah lasalocidu sodného musí byť označený na štítku v prípade ak sú tieto látky pridané do predzmesí a krmív;

(3) keďže musia byť stanovené analytické metódy spoločenstva pre kontrolu týchto látok;

(4) keďže opatrenia upravené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty stanovia, že analýzy vykonávané s cieľom úradnej kontroly obsahu lasalocidu v krmivách a predzmesiach sa vykonávajú pomocou metódy opísanej v prílohe k tejto smernici.

Článok 2

Členské štátypríjmu, najneskôr do 31. januára 2000, zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné pre dosiahnutie súladu s ustanoveniami tejto smernice. Budú o tom bezodkladne informovať Komisiu.

Opatrenia uplatnia od 1. februára 2000.

Keď členské štáty prijmú tieto opatrenia, budú tieto obsahovať odkaz na túto smernicu alebo budú doplnené o takýto odkaz v čase svojho úradného uverejnenia. Členské štáty prijmú postup pre takýto odkaz.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť 20. deň po svojom uverejnení v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 23. júla 1999

Za Komisiu

Franz FISCHLER

člen Komisie

---

[1] Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
[2] Ú. v. ES L 270, 14.12.1970, s. 1.
[3] Ú. v. ES L 108, 27.4.1999, s. 20.

PRÍLOHA

STANOVENIE LASALOCIDU SODNÉHO

Sodná soľ polyéterovej monokarboxylovej kyseliny produkovanej *Streptomyces lasaliensis*

1. **Rozsah a účel**

Metóda je pre stanovenie lasalocidu sodného v krmivách a predzmesiach. Limit zistenia je 5mg/kg, limit stanovenia je 30 mg/kg.

2. **Princíp**

Lasalocid sodný je extrahovaný zo vzorky do okysleného metanolu a stanovený pomocou vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie s obrátenou fázou (HPLC – high performance liquid chromatography) pomocou spektrofluorimetrického detektora.

3. **Činidlá**

3.1. Dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.2. Kyselina ortofosforečná, w = 85 %

3.3. Roztok kyseliny ortofosforečnej, σ = 20 %

Zrieďte vodou 23,5 ml kyseliny fosforečnej (3.2) na 100 ml.

3.4. 6-metyl-2-heptylamín (1,5 – dimetylhexylamín), w = 99 %

3.5. Metanol, akosť HPLC

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

3.7. Tlmivý roztok fosforečnanu, c = 0,01 mol/l

Rozpustite 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) v 500 ml vody (3.11), pridajte 3,5 ml kyseliny ortofosforečnej (3.2) a 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamínu (3.4). Upravte pH na 4,0 roztokom kyseliny ortofosforečnej (3.3) a zrieďte vodou na 1 000 ml (3.11).

3.8. Okyslený metanol

Preveďte 5,0 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.6) do 1 000 ml kalibrovanej banky, doplňte po značku metanolom (3.5) a zmiešajte. Tento roztok musí byť pripravený čerstvý pred použitím.

3.9. HPLC mobilná fáza, roztok metanolu tlmený fosforečnanom 5 + 95 (V + V)

Zmiešajte 5 ml roztoku fosforečnanu (3.7) s 95 ml metanolu (3.5).

3.10. Štandardná látka lasalocid sodný so zaručenou čistotou, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sodná soľ polyéterovej monokarboxylovej kyseliny vyrobená Streptomyces lasaliensis), E763

3.10.1. Štandardný zásobný roztok lasalocidu sodného, 500 µg/ml

Odvážte po najbližší 0,1 mg, 50 mg lasalocidu sodného (3.10) do 100 ml kalibrovanej banky, rozpustite v okyslenom metanole (3.8), doplňte po značku rovnakým rozpúšťadlom a zmiešajte. Tento roztok musí byť čerstvo pripravený pred použitím.

3.10.2. Pomocný štandardný roztok lasalocidu sodného, 50 µg/ml

Pipetujte 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.10.1) do 100 ml kalibrovanej banky, doplňte po značku okysleným metanolom (3.8) a zmiešajte. Tento roztok musí byť čerstvo pripravený pred použitím.

3.10.3. Kalibračné roztoky

Do radu 50 ml kalibrovaných baniek preneste 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 a 10.0 ml pomocného štandardného roztoku (3.10.2). Doplňte po značku okysleným metanolom (3.8) a zmiešajte. Tieto roztoky zodpovedajú 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 a 10.0 µg lasalocidu sodného na 1 ml. Tieto roztoky musia byť čerstvo pripravené pred použitím.

3.11. Voda, HPLC akosť

4. **Prístroje**

4.1. Ultrazvukový kúpeľ (alebo vodný kúpeľ v trepačke) s reguláciou teploty

4.2. Membránové filtre, 0,45 μm

4.3. HPLC zariadenie so vstrekovacím systémom, vhodné pre vstrekovanie objemov 20 μl.

4.3.1. Kvapalinový chromatografický stĺpec 125 mm x 4 mm, s obrátenou fázou C18, balenie 5 μm alebo ekvivalentné

4.3.2. Spektrofluorimeter s úpravou excitácie a emisnej vlnovej dĺžky premenlivou vlnovou dĺžkou

5. **Postup**

5.1. Všeobecne

5.1.1. Slepé krmivo

Pre vykonanie testu regenerácie (5.1.2) by sa malo analyzovať slepé krmivo, aby sa skontrolovalo, že nie sú prítomné ani lasalocid sodný ani rušivé látky. Slepé krmivo by malo byť typovo podobné vzorke a lasalocid sodný alebo rušivé látky by nemali byť zistené.

5.1.2. Test regenerácie

Test regenerácie by sa mal vykonať analyzovaním slepého krmiva, ktoré bolo zosilnené pridaním určitého množstva lasalocidu sodného, podobného tomu, ktorý je prítomný vo vzorke. Aby sa posilnilo na úroveň 100 mg/kg, preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.10.1) do 250 ml kužeľovej banky a nechajte odparovať roztok do približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepého krmiva, dôkladne premiešajte a nechajte 10 minút, pričom miešajte opäť niekoľkokrát pred ďalším krokom – extrakciou (5.2).

Prípadne, ak nie je k dispozícii slepé krmivo typovo podobné vzorke (pozri 5.1.1), možno test regenerácie vykonať štandardnou metódou pripočítania. V takom prípade je vzorka, ktorú je potrebné analyzovať, posilnená množstvom lasalocidu sodného, ktorý je podobný množstvu, ktorý je už prítomný vo vzorke. Táto vzorka je analyzovaná spolu s neposilnenou vzorkou a regenerácia sa vypočíta odpočítaním.

5.2. Extrakcia

5.2.1. Krmivá

Odvážte po najbližšiu 0,01 g, od 5 g po 10 g vzorky do 250 ml kužeľovej banky s uzáverom. Pridajte 100,0 ml okysleného metanolu (3.8) pipetou. Voľne uzavrite a rýchlo krúžte bankou tak, aby došlo k disperzii. Umiestnite banku do ultrazvukového kúpeľa (4.1) pri približne 40 °C počas 20 minút, potom zoberte a ochladťe na izbovú teplotu. Nechajte postáť približne 1 hodinu, kým sa suspendovaná látka neusadí, potom prefiltrujte pomernú časť cez 0,45 μm membránový filter (4.2) do vhodnej nádoby. Pristúpte k HPLC stanoveniu (5.3).

5.2.2. Predzmesi

Odvážte na najbilžší 0,001 g približne 2 g nerozomletej predzmesi do 250 ml kalibrovanej banky. Pridajte 100,0 ml okysleného metanolu (3.8) a rýchlo krúžte, aby došlo k disperzii. Umiestnite banku a obsah do ultrazvukového kúpeľa (4.1) pri približne 40 °C na 20 minút, potom vyberte a ochladťe na izbovú teplotu. Zrieďte po značku okysleným metanolom (3.8) a dôkladne premiešajte. Nechajte postáť jednu hodinu, kým sa suspendovaná látka neusadí, potom prefiltrujte pomernú časť cez 0,45 μm membránový filter (4.2). Rozrieďte primeraný objem čistého filtrátu okysleným metanolom (3.8), tým sa pripraví roztok pre konečný test, ktorý obsahuje približne 4 μg/ml lasalocidu sodného. Pristúpte k HPLC stanoveniu (5.3).

5.3. Stanovenie HPLC

5.3.1. Parametre

Ako orientačné sú ponúknuté nasledujúce podmienky; je možné použiť iné podmienky za predpokladu, že budú mať rovnocenné výsledky:

Kvapalinový chromatografický stĺpec (4.3.1):	125 mm x 4 mm, C18 s obrátenou fázou, balenie 5 μm alebo rovnocenné
Mobilná fáza (3.9):	Zmes tlmiaceho roztoku fosforečnanu (3.7) a metanolu (3.5), 5 + 95(V + V)
Prietok:	1,2 ml/min.
Detekčné vlnové dĺžky:	
– Excitácia	310 nm
– Emisia:	419 nm
Objem vstrekovania:	20 μl

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému, vstreknutím kalibračného roztoku (3.10.3) obsahujúceho 4,0 µg/ml niekoľkokrát, kým sa nedosiahnu konštantné výšky vrcholov (alebo oblastí) a časy retencie.

5.3.2. Kalibračný graf

Vstrieknite každý kalibračný roztok (3.10.3) niekoľkokrát a stanovte stredné vrcholové výšky (oblasti) pre každú koncentráciu. Narysujte kalibračný graf pomocou stredných vrcholových výšok (oblastí) ako súradníc y a zodpovedajúcich koncentrácií v µg/ml ako súradníc x.

5.3.3. Roztok vzorky

Vstreknite extrakty vzoriek získané v 5.2.1 alebo 5.2.2 niekoľkokrát, použitím rovnakého objemu, ako bol odobratý pre kalibračný roztok, a stanovte stredné vrcholové výšky (oblasti) pre vrcholové hodnoty lasalocidu sodného.

6. Výpočet výsledkov

Zo strednej vrcholovej výšky (oblasti) vytvorenej vstrekovaním roztoku vzorky (5.3.3) stanovte koncentráciu lasalocidu sodného (µg/ml) odkazom na kalibračný graf.

6.1. Krmivá

Obsah lasalocidu sodného, w (mg/kg) vo vzorke je daný nasledujúcim vzorcom:

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

kde:

β = koncentrácia lasalocidu sodného v roztoku vzorky (5.2.1) v µg/ml

V_1 = objem extraktu vzorky podľa 5.2.1 v ml (t. j. 100)

m = hmotnosť testovanej dávky v g

6.2. Predzmesi

Obsah lasalocidu sodného, w (mg/kg) vo vzorke je daný nasledovným vzorcom:

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

kde:

β = koncentrácia lasalocidu sodného v roztoku vzorky (5.2.2) v µg/ml

V_2 = objem extraktu vzorky podľa 5.2.2 v ml (t. j. 250)

f = faktor zriedenia podľa 5.2.2.m = hmotnosť testovanej dávky v g

7. Overenie výsledkov

7.1. Totožnosť

Metódy založené na spektrofluorimetrii menej podliehajú rušeniu, než tie, v ktorých sa používa detekcia ultrafialovým žiarením. Analytická totožnosť môže byť potvrdená súbežnou chromatografiou.

7.1.1. Súbežná chromatografia

Vzorkový extrakt (5.2.1 alebo 5.2.2) je posilnený pridaním primeraného množstva kalibračného roztoku (3.10.3). Množstvo pridaného lasalocidu sodného by malo byť podobné množstvu lasalocidu sodného zisteného v extrakte vzorky. Iba výška vrcholu lasalocidu sodného by mala byť rozmerovo posilnená do rozsahu založenom na množstve pridaného lasalocidu sodného a zriedení extraktu. Šírka vrcholu v polovičnej výške musí byť v rozsahu ± 10 % pôvodnej šírky vrcholu vytvorenej neposilneným extraktom vzorky.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch súbežných stanovení vykonaných na rovnakej vzorke nesmie presiahnuť:

— 15 % voči vyššej hodnote pre obsah lasalocidu sodného od 30 mg/kg po 100 mg/kg

— 15 mg/kg pre obsah lasalocidu sodného od 100 mg/kg po 200 mg/kg;

— 7,5 % voči vyššej hodnote pre obsah lasalocidu sodného nad 200 mg/kg.

7.3. Regenerácia

Pre posilnenú vzorku slepého krmiva, by regenerácia mala byť aspoň 80 %. U posilnených vzoriek predzmesí by regenerácia mala byť aspoň 90 %.

8. Výsledky štúdie v spolupráci

Bola zostavená štúdia ([1]) v spolupráci, v ktorej boli analyzované 2 predzmesi (vzorky 1 a 2) a 5 krmív (vzorky 3-7) 12 laboratóriami. Na každej vzorke boli vykonané duplicitné analýzy. Výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

([1]) Analyst, 1995, 120, 2175 – 2180.

Vzorka 1 Kuracia predzmes	Vzorka 2 Morčacia predzmes	Vzorka 3 Morčacie pelety	Vzorka 4 Kuracie drobky	Vzorka 5 Morčacia potrava	Vzorka 6 Hydinová potrava A	Vzorka 7 Hydinová potrava B	
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Stred (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
Nominál. obsah (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (+)	35 (+)

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých výsledkov

S_r = štandardná odchýlka opakovatelnosti

S_R = štandardná odchýlka reprodukovatelnosti

CV_r = koeficient variácie opakovatelnosti, %

CV_R = koeficient variácie reprodukovatelnosti, %

(*) obsah deklarovaný výrobcom

(+) potrava pripravená v laboratóriu