31999L0076

6.8.1999 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI L 207/13

DIREKTIVA KOMISIJE 1999/76/ES

z dne 23. julija 1999

o določitvi analitskih metod Skupnosti za določanje lasalocid natrija v krmi

(Besedilo velja za EGP)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ([1]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Avstrije, Finske in Švedske, in zlasti člena 2 Direktive,

(1) ker Direktiva 70/373/EGS določa, da je treba uradni nadzor krme za preverjanje skladnosti z zahtevami, ki izhajajo iz zakonov ali drugih predpisov glede njihove kakovosti in sestave, izvajati z uporabo metod vzorčenja in analitske metode Skupnosti;

(2) ker Direktiva Sveta 70/524/EGS z dne 23. novembra 1970 o dodatkih krmi ([2]), kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije (ES) št. 866/1999 z dne 26. aprila 1999 ([3]) določa, da mora biti vsebnost lasalocid natrija navedena na oznaki, če so te snovi dodane v premikse in krmila;

(3) ker je treba določiti analitske metode Skupnosti za preverjanje teh snovi;

(4) ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice zagotovijo, da se analize, opravljene zaradi uradnega nadzora vsebnosti lasalocida v krmi in premiksih, izvajajo z metodami, navedenimi v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. januarja 2000. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Ukrepe uporabljajo od 1. februarja 2000.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicevanja določijo države članice.

Člen 3

Ta direktiva začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 23. julija 1999

Za Komisijo

Franz FISCHLER

Član Komisije

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

PRILOGA

DOLOČANJE LASALOCID NATRIJA

Natrijeva sol polieter monokarboksilne kisline, proizvedena s streptomices lasaliensis

1. **Namen in področje uporabe**

Metoda je namenjena določanju lasalocid natrija v krmi in premiksih. Meja zaznavnosti je 5 mg/kg, meja določanja je 30 mg/kg.

2. **Princip**

Lasalocid natrij ekstrahiramo iz vzorca v nakisani metanol in določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo spektrofluorimetričnega detektorja.

3. **Reagenti**

3.1 Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)

3.2 Ortofosforjeva kislina, w = 85 %

3.3 Raztopina ortofosforjeve kisline, σ = 20 %

Razredčimo 23,5 ml ortofosforjeve kisline (3.2) s 100 ml vode.

3.4 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), w = 99 %

3.5 Metanol, za HPLC

3.6 Klorovodikova kislina, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7 Fosfatna pufrna raztopina, c = 0,01 mol/l

Raztopimo 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) v 500 ml vode (3.11), dodamo 3,5 ml ortofosforjeve kisline (3.2) in 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (3.4). pH naravnamo na 4,0 z raztopino ortofosforjeve kisline (3.3) in razredčimo z vodo (3.11) do 1 000 ml.

3.8 Nakisani metanol

5,0 ml klorovodikove kisline (3.6) prenesemo v 1 000-mililitrsko merilno bučko, napolnimo z metanolom (3.5) do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.9 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), raztopina fosfatnega pufra in metanola 5 + 95 (V + V)

Zmešamo 5 ml fosfatne pufrne raztopine (3.7) s 95 ml metanola (3.5).

3.10 Lasalocid natrij standardna substanca zagotovljene čistosti, $C_{14}H_{53}O_8Na$ (natrijeva sol polieter monokarboksilne kisline, proizvedena s streptomices lasaliensis), E763

3.10.1 Lasalocid natrij, osnovna standardna raztopina, 500 µg/ml

Natehtamo 50 mg lasolocid natrija (3.10) s točnostjo 0,1 mg v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopimo v nakisanem metanolu (3.8), napolnimo z istim topilom do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.10.2 Lasalocid natrij, vmesna standardna raztopina, 50 µg/ml

Odipetiramo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.10.1) v 100-mililitrsko merilno bučko, napolnimo z nakisanim metanolom (3.8) do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.10.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50-mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml in 10,0 ml vmesne standardne raztopine (3.10.2). Do oznake napolnimo z nakisanim metanolom (3.8) in premešamo. Te raztopine ustrezajo 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg, 5,0 µg in 10,0 µg lasalocid natrija na ml. Raztopine moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.11 Voda, za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

4. **Oprema**

4.1 Ultrazvočna kopel (ali stresalna vodna kopel) z nadzorom temperature

4.2 Membranski filtri, 0,45 µg

4.3 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z injektorskim sistemom, primernim za prostornine vbrizga 20 µl.

4.3.1 Kolona 125 mm x 4 mm za tekočinsko kromatografijo, reverzna faza C18, 5 µm polnilo ali enakovredna.

4.3.2 Spektrofluorimeter s spremenljivo nastavitvijo valovnih dolžin vzbujanja in emisije

5. **Postopek**

5.1 Splošno

5.1.1 Slepa krma

Za izvedbo preskusa izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo, da preverimo, da niso prisotni niti lasalocid natrij niti moteče substance. Slepa krma naj bo podobne vrste kot vzorec in v njej ne smemo zaznati lasalocid natrija ali motečih substanc.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo z analiziranjem slepe krme, ki smo jo obogatili z dodatkom količine lasalocid natrija, podobni količini, prisotni v vzorcu. Za obogatitev na 100 mg/kg prenesemo 10,0 ml osnovnega standarda (3.10.1) v 250-mililitrsko erlenmajerico in uparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, dobro premešamo in pustmo 10 minut ter vmes nekajkrat ponovno premešamo, nato nadaljujemo postopek ekstrakcije (5.2).

Če nimamo slepe krme podobne vrste, kot je vzorec (5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo z metodo standardnega dodatka. V tem primeru se vzorec, ki ga bomo analizirali, obogati z dodatkom lasalocid natrija, podobnega tistemu, ki je že prisoten v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z neobogatenim vzorcem, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

5.2 Ekstrakcija

5.2.1 Krma

Natehtamo od 5 g do 10 g vzorca s točnostjo 0,01 mg v 250-mililitrsko erlenmajerico z zamaškom. S pipeto dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.8). Rahlo zapremo zamašek in zavrtimo, da se delci razpršijo. Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.1) pri približno 40 °C za 20 minut, nato jo odstranimo iz kopeli in ohladimo na sobno temperaturo. Pustimo stati približno eno uro, dokler se suspenzija ne obori, nato filtriramo alikvot skozi 0,45 µg membranski filter (4.2) v primerno posodo. Nadaljujemo določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (5.3).

5.2.2 Premiksi

Natehtamo približno 2 g nezmletega premiksa s točnostjo 0,001 mg v 250-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.8) in zavrtimo, da se delci razbijejo. Bučko z vsebino postavimo v ultrazvočno kopel (4.1) pri približno 40 °C za 20 minut, nato jo odstranimo iz kopeli in ohladimo na sobno temperaturo. Razredčimo do oznake z nakisanim metanolom (3.8) in dobro premešamo. Pustimo stati eno uro, dokler se suspenzija ne obori, nato filtriramo alikvot skozi 0,45 µg membranski filter (4.2). Primeren volumen čistega filtrata razredčimo z nakisanim metanolom (3.8), da dobimo končno preskusno raztopino, ki vsebuje približno 4 µg/ml lasalocid natrija. Nadaljujemo določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (5.3).

5.3 Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

5.3.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, uporabijo se lahko tudi drugi, če z njimi dobimo enakovredne rezultate:

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.3.1)	125 mm x 4 mm, reverzna faza C18, polnilo 5 µm ali enakovredno
Mobilna faza (3.9)	Mešanica fosfatne pufrne raztopine (3.7) in metanola (3.5), 5 + 95 (V + V)
Hitrost pretoka	1,2 ml/min
Valovne dolžine detektorjev:	
– vzbujanje:	310 nm
– emisija:	419 nm
Volumen vbrizga:	20 µl

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo 4,0 µg/ml raztopine za umeritev (3.10.3), dokler niso dosežene konstantne višine (ali površine) vrhov in retenzijskih časov.

5.3.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.10.3) večkrat vbrizgamo in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Narišemo umeritveno krivuljo, tako da srednje vrednosti višin (površin) vrhov nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakte vzorca, dobljene po 5.2.1 ali 5.2.2 in pri tem uporabimo enake volumne kot pri raztopinah za umeritev ter določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov lasalocid natrija.

6. Izračun rezultatov

Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov, ki smo jih dobili z vbrizganjem raztopine vzorca (5.3.3), določimo koncentracijo lasalocid natrija (µg/ml) iz umeritvene krivulje.

6.1 Krma

Vsebnost lasalocid natrija w (mg/kg) v vzorcu je dana z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

β = koncentracija lasalocid natrija v raztopini vzorca (5.2.1) v µg/ml

V_1 = volumen ekstrakta vzorca v skladu z 5.2.1 v ml (tj. 100)

m = masa preskusnega vzorca v g

6.2 Premiksi

Vsebnost lasalocid natrija w (mg/kg) v vzorcu je dana z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

β = koncentracija lasalocid natrija v raztopini vzorca (5.2.2) v µg/ml

V_2 = volumen ekstrakta vzorca v skladu z 5.2.2 v ml (tj. 250)

f = faktor razredčitve v skladu s 5.2.2m=masa preskusnega vzorca v g

7. Validacija rezultatov

7.1 Identiteta

Metode, ki temeljijo na spektrofluorimetriji, imajo manj motenj kot metode, pri katerih se uporablja UV-detekcija. Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umeritev (3.10.1). Množina dodanega lasalocid natrija naj bo podobna množini lasalocid natrija v ekstraktu vzorca. Povišan je lahko vrh lasalocid natrija na vrednost, ki temelji na množini dodanega lasalocid natrija in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine vrha, ki smo ga dobili z neobogatenim ekstraktom vzorca.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

— 15 % relativno glede na višjo vrednost, za vsebnosti lasalocid natrija od 30 mg/kg do 100 mg/kg;

— 15 mg/kg za vsebnosti lasalocid natrija od 100 mg/kg do 200 mg/kg;

— 7,5 % relativno glede na višjo vrednost, za vsebnosti lasalocid natrija več kot 200 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Za obogateno (slepo) krmo naj bi bil izkoristek najmanj 80 %. Za obogatene vzorce premiksov naj bi bil izkoristek najmanj 90 %.

8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija ([1]), v kateri je 12 laboratorijev analiziralo 2 premiksa (vzorca 1 in 2) in 5 krmil (vzorci 3–7). Za vsak vzorec sta bili opravljeni dve analizi. Rezultati so v naslednji tabeli:

([1]) Analyst, 1995, 120, 2175–2180.

	Vzorec 1 Premiks za piščance	Vzorec 2 Premiks za purane	Vzorec 3 Peleti za purane	Vzorec 4 Drobtinice za piščance	Vzorec 5 Krma za purane	Vzorec 6 Krma za perutnino A	Vzorec 7 Krma za perutnino B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrednost(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
Nominalna vsebnost (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50+	35+

L = število laboratorijev

n = število posameznih rezultatov

S_r = standardni odmik ponovljivosti

S_R = standardni odmik obnovljivosti

CV_r = koeficient variacije ponovljivosti v %

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti v %

* vsebnost po proizvajalčevi deklaraciji

\+ krma, pripravljena v laboratoriju