31999L0076

DIRECTIVA 1999/76/CE A COMISIEI
din 23 iulie 1999
de stabilire a unei metode comunitare pentru dozarea de lasalocid–sodiu în furaje

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor [1], astfel cum a fost modificată ultima dată prin actul de aderare a Austriei, Finlandei și Suediei, în special articolul 2,

(1) întrucât Directiva 70/373/CEE prevede că respectivele controale oficiale ale furajelor prin care se urmărește să se constate respectarea condițiilor prevăzute în temeiul actelor cu putere de lege și actelor administrative privind calitatea și compoziția lor trebuie să fie efectuate în conformitate cu modalitățile de prelevare de probe și metodele comunitare de analiză;

(2) întrucât Directiva 70/524/CEE a Consiliului din 23 noiembrie 1970 privind aditivii din hrana animalelor [2], astfel cum a fost modificată ultima dată de Regulamentul (CE) nr. 866/1999 [3] al Comisiei prevede să se menționeze conținutul de lasalocid–sodiu pe etichetă atunci când aceste substanțe sunt adăugate în preamestecuri sau în furaje combinate;

(3) întrucât trebuie definite metodele comunitare de analiză prin care să se constate prezența acestor substanțe;

(4) întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru hrana animalelor,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre prevăd ca analizele efectuate pentru controlul oficial al conținutului furajelor și al preamestecului de lasalocid–sodiu să se realizeze în conformitate cu metodele prevăzute în anexa la prezenta directivă.

Articolul 2

Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 31 ianuarie 2000. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Dispozițiile în cauză sunt aplicate începând de la 1 februarie 2000.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele conțin o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre adoptă modalitățile de efectuare a acestei trimiteri.

Articolul 3

Prezenta directivă intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 4

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 23 iulie 1999.

Pentru Comisie,

Franz FISCHLER

Membru al Comisiei

---

(1) JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
(2) JO L 270, 14.12.1970, p. 1.
(3) JO L 108, 27.4.1999, p. 20.

ANEXĂ

DOZAREA LASALOCID–SODIULUI

Sarea sodică de polieter a acidului monocarboxilic, produsă de *Streptomyces lasaliensis*

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Metoda permite dozarea lasalocid–sodiului în furaje și în preamestecuri. Limita de detectare este de 5 mg/kg, limita de dozare este de 30 mg/kg.

2. **Principiu**

Lasalocid–sodiul este extras din eșantion prin metanol acidifiat și dozat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLHP) în fază inversată cu ajutorul unui detector spectrofluorimetric.

3. **Reactivi**

3.1. Fosfat monopotasic (KH_2PO_4)

3.2. Acid ortofosforic, w = 85 %

3.3. Soluție de acid ortofosforic, σ = 20 %

Se diluează 23,5 ml acid ortofosforic (3.2) în apă și se completează până la 100 ml.

3.4. 6–metil–2–heptilamin (1,5–dimetilhexilamin), w = 99 %

3.5. Metanol, de calitate CLHP

3.6. Acid clorhidric, ρ_{20}, 1,19 g/ml

3.7. Soluție-tampon de fosfat, c = 0,01 mol/l

Se dizolvă 1,36 g de KH_2PO_4 (3.1) în 500 ml de apă (3.11), se adaugă 3,5 ml acid ortofosforic (3.2) și 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamin. Se ajustează pH-ul la 4,0 cu ajutorul soluției de acid ortofosforic (3.3), se diluează în apă și se completează până la 1 000 ml (3.11).

3.8. Metanol acidifiat

Se transferă 5,0 ml acid clorhidric (3.6) într-un balon cu măsura de 1 000 ml, se pune în raport cu metanol (3.5) și se amestecă. Soluția trebuie înnoită la fiecare folosire.

3.9. Fază mobilă pentru CLHP, soluție-tampon de fosfat 5 + 95 (V + V)

Se amestecă 5 ml de soluție-tampon de fosfat (3.7) cu 95 ml de metanol (3.5)

3.10. Substanță etalon: lasalocid–sodiu garantat pur, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sare sodică de polieter a acidului monocarboxilic, produsă de *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Soluție-mamă a etalonului de lasalocid–sodiu, 500 µg/ml

Se cântăresc la 0,1 mg aproape 50 mg de lasalocid–sodiu (3.10) într–un balon cu măsura de 100 ml, se dizolvă în metanol acidifiat (3.8), se pune în raport cu același solvent și se amestecă. Soluția trebuie înnoită pentru fiecare folosire.

3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid–sodiu, 50 µg/ml

Se pun cu pipeta 10,0 ml din soluția-mamă a etalonului (3.10.1) într–un balon cu măsura de 100 ml, se pune în raport cu metanol acidifiat (3.8) și se amestecă. Soluția trebuie înnoită pentru fiecare folosire.

3.10.3. Soluții de etalonaj

Se transferă 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 și 10,0 ml din soluția etalon intermediară (3.10.2) într–o serie de baloane cu măsura de 50 ml. Se adaugă metanol acidifiat (3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund respectiv la 1,0; 2,0; 4.0; 5,0 și 10,0 µg de lasalocid–sodiu pe ml și trebuie să fie reînnoite pentru fiecare folosire.

3.11. Apă de calitate CLHP

4. **Aparatura**

4.1. Baie ultrasonică (sau baie marină vibrantă) cu reglaj de temperatură

4.2. Filtre cu membrană de 0,45 µm

4.3. Echipament CLHP cu sistem de injecție permițând injectarea de volume de 20 µl

4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă de 125 mm × 4 mm, în fază inversată C18, umplută cu 5 µm sau echivalent

4.3.2. Spectrofluorimetru cu corecție a lungimilor de undă variabile (solicitare și emisie)

5. **Mod de operare**

5.1. Generalități

5.1.1. Eșantion de hrană martor

Pentru a proceda la testul de recuperare (5.1.2), se analizează un eșantion de hrană martor pentru a verifica absența lasalocid–sodiului sau a substanțelor interferente. Eșantionul de hrană martor trebuie să fie de același tip cu cel din eșantion; în acesta nu trebuie să fie detectate nici lasalocid–sodiu, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza eșantionului de hrană martor la care a fost adăugată o cantitate de lasalocid–sodiu similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml din soluția mamă a etalonului (3.10.1) într–un balon conic de 250 ml și se concentrează soluția prin evaporare la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de hrană martor, se amestecă cu grijă și se lasă în repaus 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de extracție (5.2).

Alternativ, în lipsa unui eșantion de hrană martor de același tip cu cel din eșantion, testul de recuperare se poate efectua conform metodei prin adăugarea etalonului (5.1.1). În acest caz, eșantionul de analizat este suplimentat cu o cantitate de lasalocid–sodiu asemănătoare celei deja prezente în eșantion. Acesta este analizat cu eșantionul nesuplimentat, iar recuperarea se poate calcula prin diferență.

5.2. Extracția

5.2.1. Furaje

Se cântăresc la 0,01 g aproape 5 g la 10 g din eșantion într–un balon conic de 250 ml cu bușon. Se pune cu pipeta în el 100,0 ml metanol acidifiat (3.8). Se astupă ușor și se agită pentru a obține o dispersie. Se pune balonul în baia ultrasonică (4.1) în jur de 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se lasă în repaus timp de o oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă pe un filtru cu membrană de 0,45 µm (4.2) într–un recipient adecvat. A se proceda la dozare prin CLHP (5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântăresc la 0,001 aproape 2 g de preamestec nesfărâmat într–un balon cu măsura de 250 ml. Se adaugă 100,0 ml de metanol acidifiat (3.8) și se agită pentru a obține o dispersie. Apoi se plasează balonul și conținutul său în baia ultrasonică (4.1) la 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se pune în reacție cu metanolul acidifiat (3.8) și se amestecă cu grijă. Se lasă în repaus timp de o oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă pe un filtru cu membrană de 0,45 µm (4.2). Se diluează un volum adecvat de filtrat clar cu metanol acidifiat (3.8), astfel încât să se obțină o soluție de încercare finală de aproximativ 4µg/ml de lasalocid–sodiu. Dozarea se face prin CLHP (5.3).

5.3. Dozare CLHP

5.3.1. Parametrii

Următoarele norme sunt propuse cu titlu orientativ; alte norme pot fi aplicate, dacă dau rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.3.1):	125 mm x 4 mm, în fază inversă C18, umplută cu 5 µm sau echivalent
Fază mobilă (3.9):	amestec de soluție tampon de fosfat (3.7) și de metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Debit:	1,2 ml/min
Lungimea undei de detectare:	
— solicitare:	310 nm
— emisie:	419 nm
Volumul de injectare:	20 µl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de etalonaj (3.10.3) conținând 4,0 µg/ml până la obținerea de înălțimi (suprafețe) de vârf și de timpi de reținere constanți.

5.3.2. Curbă de etalonaj

Se injectează fiecare soluție de etalonaj (3.10.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (suprafețele) mijlocii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se stabilește o curbă de etalonaj utilizând înălțimile (suprafețele) mijlocii ale vârfurilor soluțiilor de etalonaj ca ordonate și concentrațiile corespondente în µg/ml ca abscise.

5.3.3. Soluția eșantionului

Se injectează extractul eșantionului (5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori, utilizând același volum cu cel reținut pentru soluțiile de etalonaj și se determină înălțimea (suprafața) mijlocie a vârfurilor lasalocid-sodiului.

6. **Exprimarea rezultatelor**

Plecând de la înălțimea (suprafața) mijlocie a vârfurilor lasalocid-sodiului soluției eșantionului (5.3.3), se determină conținutul de lasalocid-sodiu (µg/ml) prin referință la curba de etalonaj.

6.1. Furaje

Conținutul w de lasalocid-sodiu, exprimat în mg/kg, al eșantionului este dat de formula următoare:

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

formulă în care:

β = conținut de lasalocid-sodiu al soluției eșantionului (5.2.1) în µg/ml

V_1 = volumul extractului eșantionului după 5.2.1. în ml (fie 100)

m = masa porțiunii de încercare în g

6.2. Preamestecuri

Conținutul w în lasalocid-sodiu, exprimat în mg/kg, al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

formulă în care:

β = conținut de lasalocid-sodiu al soluției eșantionului (5.2.2) în µg/ml

V_2 = volumul extractului eșantionului după 5.2.2. în ml (fie 250)

f = factorul de diluție după 5.2.2.

m = masa porțiunii de încercare în g

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. Identitate

Metodele bazate pe spectrofluorimetrie sunt mai puțin supuse interferențelor decât cele care utilizează un detector UV. Identitatea analitului poate fi confirmată prin cocromatografie.

7.1.1. Cocromatografie

Un extract al eșantionului (5.2.1 sau 5.2.2) este adiționat cu o cantitate corespunzătoare soluției de etalonaj (3.10.3). Cantitatea de lasalocid–sodiu adăugată trebuie să fie asemănătoare cantității de lasalocid–sodiu constatată în extractul eșantionului. Numai înălțimea vârfului lasalocid–sodiului trebuie crescută ținând seama de cantitatea adăugată și de diluția extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii trebuie să se situeze la ± 10 % din lărgimea inițială a vârfului de lasalocid–sodiu a extractului eșantionului nesuplimentat.

7.2. Repetabilitate

Diferența între rezultatele a două dozări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 15 % din rezultatul superior pentru conținuturile de lasalocid–sodiu situate între 30 mg/kg și 100 mg/kg;

— 15 mg/kg pentru conținuturile de lasalocid–sodiu situate între 100 mg/kg și 200 mg/kg;

— 7,5 % din rezultatul superior pentru conținuturile de lasalocid–sodiu de mai mult de 200 mg/kg.

7.3. Recuperare

Pentru un eșantion (martor) suplimentat, randamentul trebuie să fie de cel puțin 80 %. Pentru eșantioanele de preamestecuri suplimentate, randamentul trebuie să fie de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu între laboratoare**

S-a efectuat un studiu între laboratoare ([1]), în cursul căruia două preamestecuri (eșantioanele 1 și 2) și 5 alimente pentru animale (eșantioanele 3–7) au fost analizate în 12 laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele studiului sunt prezentate în continuare:

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

	Eșantion 1 Preamestec pui	Eșantion 2 Preamestec curci	Eșantion 3 Granulate curci	Eșantion 4 Firimituri pui	Eșantion 5 Hrană curci	Eșantion 6 Hrană păsări A	Eșantion 7 Hrană păsări B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Media (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
Conținut nominal (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (+)	35 (+)

L = numărul de laboratoare
n = numărul de valori individuale
s_r = abaterea standard a repetabilității
s_R = abaterea standard a reproductibilității
CV_r = coeficientul de variație al repetabilității, %
CV_R = coeficientul de variație al reproductibilității, %
(*) conținut declarat de fabricant
(+) aliment preparat în laborator