

KOMMISSIONENS DIREKTIV 1999/76/EF

af 23. juli 1999

om fastsættelse af fællesskabsanalysemetoder til bestemmelse af lasalocid natrium i foderstoffer

(EØS-relevant tekst)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —
under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 70/373/EØF af 20. juli 1970 om indførelse af fællesskabsprøveudtagningsmåder og -analysemetoder for så vidt angår den officielle kontrol med foderstoffer ⁽¹⁾, senest ændret ved akten vedrørende Østrigs, Finlands og Sveriges tiltrædelse, særlig artikel 2, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Direktiv 70/373/EØF fastsætter, at den officielle kontrol med foderstoffer til konstatering af, om de betingelser, der er fastsat ved lov eller administrative bestemmelser, for foderstoffers beskaffenhed og sammensætning er opfyldt, foretages efter fælles prøveudtagningsmåder og -analysemetoder;
- (2) desuden foreskriver Rådets direktiv 70/524/EØF af 23. november 1970 om tilsætningsstoffer til foderstoffer ⁽²⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 866/1999 ⁽³⁾, at indholdet af lasalocid natrium skal være angivet i mærkningen, hvis dette stof tilsættes til forblandinger og foderstoffer;
- (3) der bør fastlægges EF-analysemetoder til kontrol af dette stof;
- (4) de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Foderstofkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at analyserne i forbindelse med den officielle kontrol af indholdet af lasalocid natrium i foder-

stoffer og forblandinger skal foretages efter de metoder, der er beskrevet i bilaget.

Artikel 2

Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for at efterkomme dette direktiv senest den 31. januar 2000. De underretter straks Kommissionen herom.

De anvender foranstaltningerne fra den 1. februar 2000.

Disse love og bestemmelser skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 23. juli 1999.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT L 170 af 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ EFT L 270 af 14.12.1970, s. 1.

⁽³⁾ EFT L 108 af 27.4.1999, s. 20.

BILAG

BESTEMMELSE AF LASALOCID NATRIUM

Natriumsalt af en monocarboxylsyrepolyether, der dannes af *Streptomyces lasaliensis*

1. Formål og anvendelsesområde

Metoden kan benyttes til bestemmelse af lasalocid natrium i foderstoffer og forblandinger. Detektionsgrænsen er 5 mg/kg, bestemmelsesgrænsen er 30 mg/kg.

2. Princip

Lasalocid natrium ekstraheres af prøven i sur methanol og bestemmes ved omvendt fase højtydende væskrokromatografi (HPLC) ved hjælp af en spektrofluorimetrisk detektor.

3. Reagenser

3.1. Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

3.2. Orthophosphorsyre, $w = 85 \%$

3.3. Orthophosphorsyreopløsning, $\sigma = 20 \%$

23,5 ml orthophosphorsyre (3.2) fortyndes med vand til 100 ml.

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

3.5. Methanol, HPLC-renhed

3.6. Saltsyre, $\rho_{20} 1,19 \text{ g/ml}$

3.7. Phosphatbufferopløsning, $c = 0,01 \text{ mol/l}$

1,36 g KH_2PO_4 (3.1) opløses i 500 ml vand (3.11), og der tilsættes 3,5 ml orthophosphorsyre (3.2) og 10,0 ml 6-methyl-2-heptylamin (3.4). pH-værdien indstilles til 4,0 med orthophosphorsyreopløsning (3.3), og der fortyndes til 1 000 ml med vand (3.11).

3.8. Sur methanol

Der overføres 5,0 ml saltsyre (3.6) til en 1 000 ml-målekolbe, tilsættes methanol (3.5) op til mærket og blandes. Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

3.9. HPLC-mobil fase, phosphatbuffer-methanolopløsning 5 + 95 (V + V).

5 ml phosphatbufferopløsning (3.7) blandes med 95 ml methanol (3.5).

3.10. Lasalocid natrium-målestof med garanteret renhed, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natriumsalt af en monocarboxylsyrepolyether, der dannes af *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Lasalocid natrium-standardstamopløsning, 500 $\mu\text{g/ml}$

50 mg lasalocid natrium (3.10) afvejes i en 100 ml målekolbe med en nøjagtighed på 0,1 mg og opløses i sur methanol (3.8), og der fyldes op til mærket med samme opløsningsmiddel og blandes. Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

3.10.2. Sekundær standardopløsning af lasalocid natrium, 50 $\mu\text{g/ml}$

Der afpipetteres 10,0 ml standardstamopløsning (3.10.1) i en 100 ml målekolbe, fyldes op til mærket med sur methanol (3.8) og blandes. Denne opløsning skal fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

3.10.3. Kalibreringsopløsninger

Der overføres 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 ml sekundær standardopløsning (3.10.2) til en række 50 ml-målekolber. Der fyldes op til mærket med sur methanol (3.8) og blandes. Disse opløsninger svarer til henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 μg lasalocid natrium pr. ml. Disse opløsninger skal fremstilles umiddelbart inden anvendelsen.

3.11. Vand, HPLC-renhed

4. Apparatur

- 4.1. Ultralydbad (eller vandbad med rysteanordning) med temperaturkontrol
- 4.2. Membranfiltre, 0,45 µm
- 4.3. HPLC-udstyr med indsprøjtningssystem, egnet til indsprøjtningsskylvolumener på 20 µl.
- 4.3.1. Væskekromatografisøjle, 125 mm x 4 mm, omvendt fase C18, 5 µm-pakning eller tilsvarende
- 4.3.2. Spektrofluorimeter med variabel indstilling af excitations- og emissionsbølgelængden

5. Fremgangsmåde

5.1. Generelt

5.1.1. Foderblindprøve

Til gennemførelse af genfindingstesten (5.1.2) analyseres en foderblindprøve for at kontrollere, at hverken lasalocid natrium eller interfererende stoffer er til stede. Foderblindprøven bør være af samme type som den prøve, der skal undersøges, og lasalocid natrium eller interfererende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. Genfindingstest

En genfindingstest bør udføres ved en analyse af foderblindprøven, hvortil der er tilsat en mængde lasalocid natrium svarende til den, som er til stede i prøven. For at nå op på et niveau på 100 mg/kg overføres der 10,0 ml standardstamopløsning (3.10.1) til en 250 ml konisk kolbe, og opløsningen inddampes til ca. 0,5 ml. Der tilsættes 50 g af blindprøven og blandes grundigt, og efter henstand i 10 min. blandes på ny flere gange, inden der fortsættes med ekstraktionstrinet (5.2).

Hvis der ikke er en foderblindprøve til rådighed af samme type som prøven (se 5.1.1), kan der alternativt udføres en genfindingstest ved hjælp af standardtilsætningsmetoden. I dette tilfælde tilsættes der til den prøve, som skal analyseres, en mængde lasalocid natrium svarende til den, der allerede er til stede i prøven. Denne prøve analyseres sammen med prøven uden tilsætning, og genfindingen beregnes ved subtraktion.

5.2. Ekstraktion

5.2.1. Foderstoffer

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes fra 5 til 10 g af prøven i en 250 ml konisk kolbe med prop. Der tilsættes 100,0 ml sur methanol (3.8) med pipette. Proppen sættes løst på, og der omrystes forsigtigt, så prøven opslæmmes. Kolben anbringes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 min., hvorefter den fjernes og afkøles til omgivelsestemperatur. Kolben henstilles i ca. 1 time, indtil opslæmningen har bundfældet sig, hvorpå en prøveportion filtreres gennem et 0,45 µm-membranfilter (4.2) ned i en egnet beholder. Der fortsættes med HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.2.2. Forblandinger

Med en nøjagtighed på 0,001 g afvejes ca. 2 g af den uformalede forblending i en 250 ml-målekolbe. Der tilsættes 100,0 ml sur methanol (3.8) og omrystes forsigtigt, så prøven opslæmmes. Kolben anbringes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 min., hvorpå den fjernes og afkøles til omgivelsestemperatur. Der fortyndes op til mærket med sur methanol (3.8) og blandes grundigt. Kolben henstilles i 1 time, indtil opslæmningen har bundfældet sig, hvorpå en prøveportion filtreres på et 0,45 µm-membranfilter (4.2). En passende mængde af det klare filtrat fortyndes med sur methanol (3.8), så der fremkommer en endelig prøveopløsning, som indeholder ca. 4 µg/ml lasalocid natrium. Der fortsættes med HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametre

Følgende betingelser er vejledende, idet andre betingelser kan anvendes, forudsat at de giver tilsvarende resultater:

Væskekromatografisøjle (4.3.1):	125 mm x 4 mm, omvendt fase C18, 5 µm-pakning eller tilsvarende
Mobil fase (3.9):	Blanding af fosfatbufferopløsning (3.7) og methanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Strømningshastighed:	1,2 ml/min
Detektionsbølgelængde:	
— Excitation:	310 nm
— Emission:	419 nm
Indsprøjtningsskylvolumen:	20 µl

Stabiliteten af det kromatografiske system kontrolleres, idet kalibreringsopløsningen (3.10.3) med 4,0 µg/ml indsprøjtes flere gange, indtil der opnås konstante tophøjder (eller arealer) og retentionstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsopløsning (3.10.3) indsprøjtes flere gange, og middeltophøjderne (-arealerne) bestemmes for hver koncentration. En kalibreringskurve afbildes med middeltophøjderne (-arealerne) som ordinat og de tilsvarende koncentrationer i µg/ml som abscisse.

5.3.3. Prøveopløsning

Prøveekstrakterne fra 5.2.1 eller 5.2.2 indsprøjtes flere gange med samme volumen som kalibreringsopløsningen, og middeltophøjderne (-arealerne) for lasalocid natrium-toppene bestemmes.

6. Beregning af resultaterne

Ud fra middeltophøjden (-arealet), der er frembragt ved indsprøjtning af prøveopløsningen (5.3.3), bestemmes koncentrationen af lasalocid natrium (µg/ml) ud fra kalibreringskurven.

6.1. Foderstoffer

Indholdet af lasalocid natrium, w (mg/kg), i prøven beregnes efter følgende formel:

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} \quad (\text{mg/kg})$$

hvor:

β = lasalocid natriumkoncentrationen af prøveopløsningen (5.2.1) i µg/ml

V₁ = volumen af prøveekstrakten ifølge 5.2.1 i ml (dvs. 100)

m = masse af prøveportionen i g.

6.2. Forblandinger

Indholdet af lasalocid natrium, w (mg/kg), i prøven beregnes efter følgende formel:

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} \quad (\text{mg/kg})$$

hvor:

β = lasalocid natriumkoncentrationen af prøveopløsningen (5.2.2) i µg/ml

V₂ = volumen af prøveekstrakten ifølge 5.2.2 i ml (dvs. 250)

f = fortyndingsfaktor ifølge 5.2.2

m = masse af prøveportionen i g.

7. Validering af resultaterne

7.1. Identitet

Metoder baseret på spektrofluorimetri er mindre udsatte for interferens end metoder, hvor der anvendes UV-detektion. Analysandens identitet kan bekræftes ved co-kromatografi.

7.1.1. Co-kromatografi

En prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) tilsættes en passende mængde kalibreringsopløsning (3.10.3). Den tilsatte mængde lasalocid natrium bør svare til den mængde lasalocid natrium, der er fundet i prøveekstrakten. Kun højden af lasalocid natriumtoppen må være blevet forstærket, svarende til den tilsatte mængde lasalocid natrium og fortyndingen af ekstrakten. Topbredden i den halve højde skal ligge inden for ± 10 % af bredden af den oprindelige top for den uforstærkede prøveekstrakt.

7.2. Repeterbarhed

Forskellen mellem resultaterne af to parallelbestemmelser udført på samme prøve må ikke overstige:

- 15 % i forhold til den største værdi for indhold af lasalocid natrium fra 30 til 100 mg/kg
- 15 mg/kg for indhold af lasalocid natrium fra 100 til 200 mg/kg
- 7,5 % i forhold til den største værdi for indhold af lasalocid natrium på over 200 mg/kg.

7.3. Genfinding

For den forstærkede foder(blind)prøve skal genfindingen være mindst 80 %. For de forstærkede forblandingsprøver skal genfindingen være mindst 90 %.

8. Resultater af en ringanalyse

Der er gennemført en ringanalyse⁽¹⁾, hvor 2 forblandinger (prøve 1 og 2) og 5 foderstoffer (prøve 3-7) blev analyseret af 12 laboratorier. Der blev udført dobbeltbestemmelse på hver prøve. Resultaterne er vist i nedenstående tabel:

⁽¹⁾ Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

	Prøve 1 Forblanding (kyllinger)	Prøve 2 Forblanding (kalkuner)	Prøve 3 Kalkunpellets	Prøve 4 Kyllinge- granulat	Prøve 5 Kalkunfoder	Prøve 6 Kyllingefoder A	Prøve 7 Kyllingefoder B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Middelværdi (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
Nominelt indhold (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50 ⁺	35 ⁺

L = antal laboratorier.

n = antal enkeltresultater.

S_r = standardafvigelse for repeterbarhed.

S_R = standardafvigelse for reproducerbarhed.

CV_r = variationskoefficient for repeterbarhed, %.

CV_R = variationskoefficient for reproducerbarhed, %.

* Indhold oplyst af fabrikanten.

⁺ Foder tilberedt på laboratoriet.