

RICHTLINIE 1999/76/EG DER KOMMISSION**vom 23. Juli 1999****zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die Bestimmung von Lasalocid-Natrium in Futtermitteln****(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Österreichs, Finnlands und Schwedens, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Gemäß der Richtlinie 70/373/EWG werden die amtlichen Untersuchungen von Futtermitteln zur Festlegung, ob die aufgrund der Rechts- und Verwaltungsvorschriften festgelegten Anforderungen an Beschaffenheit und Zusammensetzung der Futtermittel erfüllt sind, nach gemeinschaftlichen Probenahmeverfahren und Analysemethoden durchgeführt.
- (2) Gemäß der Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in Tierernährung ⁽²⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie (EG) Nr. 866/1999 der Kommission ⁽³⁾ muß der Gehalt an Lasalocid-Natrium bei der Etikettierung angegeben werden, wenn dieser Stoff Vormischungen oder Futtermitteln zugesetzt wird.
- (3) Es sind gemeinschaftliche Analysemethoden für die Kontrolle dieses Stoffs festzulegen.
- (4) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß die Analysen für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln und Vormischungen auf ihren Gehalt an Lasalocid-Natrium nach den im Anhang beschriebenen Methoden durchgeführt werden.

Artikel 2

Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen spätestens bis zum 31. Januar 2000 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um den Bestimmungen dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission davon unverzüglich in Kenntnis.

Sie wenden die Maßnahmen ab dem 1. Februar 2000 an.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

*Artikel 3*Diese Richtlinie tritt am zwanzigsten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.*Artikel 4*

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 23. Juli 1999

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission⁽¹⁾ ABl. L 170 vom 3.8.1970, S. 2.⁽²⁾ ABl. L 270 vom 14.12.1970, S. 1.⁽³⁾ ABl. L 108 vom 27.4.1999, S. 20.

ANHANG

BESTIMMUNG VON LASALOCID-NATRIUM

Monocarboxylsäure-Polyether-Natriumsalz gebildet von *Streptomyces lasaliensis*

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode dient der Bestimmung von Lasalocid-Natrium in Futtermitteln und Vormischungen. Die Nachweisgrenze beträgt 5 mg/kg, die Bestimmungsgrenze 30 mg/kg.

2. Prinzip

Lasalocid-Natrium wird aus der Probe mit angesäuertem Methanol extrahiert und durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC) unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors bestimmt.

3. Reagenzien

3.1. Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

3.2. Orthophosphorsäure, w = 85 %

3.3. Orthophosphorsäurelösung, $\sigma = 20$

23,5 ml Orthophosphorsäure (3.2) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

3.4. 6-Methyl-2-heptylamin (1,5-Dimethylhexylamin), w = 99 %

3.5. Methanol, HPLC-Qualität

3.6. Salzsäure, ρ_{20} 1,19 g/ml

3.7. Phosphatpufferlösung, c = 0,01 mol/l

1,36 g KH_2PO_4 (3.1) werden in 500 ml Wasser (3.11) gelöst, 3,0 ml Orthophosphorsäure (3.2) und 10,0 ml 6-Methyl-2-Heptylamin (3.4) hinzugefügt. Den pH-Wert mit Orthophosphorsäurelösung (3.3) auf pH 4,0 einstellen und mit Wasser (3.11) auf 1 000 ml auffüllen

3.8. Angesäuertes Methanol

5,0 ml Salzsäure (3.6) werden in einen 1 000-ml-Meßkolben gegeben und mit Methanol (3.5) bis zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muß vor jeder Verwendung frisch hergestellt werden

3.9. Mobile Phase für die HPLC: Phosphatpuffer-Methanollösung 5 + 95 (V + V)

5 ml der Phosphatpufferlösung (3.7) werden mit 95 ml Methanol (3.5) vermischt

3.10. Lasalocid-Natrium-Standard-Substanz, rein, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (Monocarboxylsäure-Polyether-Natriumsalz gebildet von *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Lasalocid-Natrium-Standard-Stammlösung, 500 $\mu\text{g/ml}$

50 mg Lasalocid-Natrium (3.10) werden auf 0,1 mg genau in einen 100-ml-Meßkolben eingewogen und in angesäuertem Methanol (3.8) gelöst. Es wird mit demselben Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muß vor Gebrauch frisch bereitet werden.

3.10.2. Lasalocid-Natrium-Standard, Lösung, 50 $\mu\text{g/ml}$

10,0 ml der Lasalocid-Natrium-Stammlösung (3.10.1) werden in einen 100-ml-Meßkolben pipettiert, es wird zur Marke mit angesäuertem Methanol (3.8) aufgefüllt und gemischt. Diese Lösung muß vor Gebrauch frisch bereitet werden.

3.10.3. Kalibrierlösungen

1,0, 2,0, 4,0, 5,0 und 10,0 ml der Lasalocid-Natrium-Standard-Lösung (3.10.2) werden jeweils in einen 50-ml-Meßkolben gegeben, es wird zur Marke mit dem angesäuerten Methanol (3.8) aufgefüllt und gemischt. Diese Kalibrierlösungen enthalten jeweils 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 und 10,0 μg Lasalocid-Natrium pro ml. Diese Lösungen müssen vor Gebrauch frisch zubereitet werden.

3.11. Wasser, HPLC-Qualität

4. Geräte

- 4.1. Ultraschallbad (oder Schüttel-Wasserbad) mit Temperatursteuerung
- 4.2. Membranfilter, 0,45 µm Porengröße
- 4.3. HPLC-System mit Injektionssystem für Volumina von 20 µl.
- 4.3.1. Trennsäule 125 mm x 4 mm, mit Umkehrphase C18, 5 µm, Fluoreszenzdetektor oder vergleichbare Säule
- 4.3.2. Fluoreszenzdetektor mit variabler Einstellung für Anregungs- und Emissionswellenlänge

5. Durchführung

5.1. Allgemeines

5.1.1. Blindprobe

Für die Durchführung des Wiederfindungsversuchs (5.1.2) sollte eine Blindprobe untersucht werden um zu prüfen, daß weder Lasalocid-Natrium noch Störsubstanzen vorhanden sind. Die Blindprobe sollte ähnlich zusammengesetzt sein wie die zu untersuchende Probe und Lasalocid-Natrium oder Störsubstanzen sollten nicht nachgewiesen werden.

5.1.2. Wiederfindungsversuch

Die Wiederfindungsrate wird ermittelt, indem eine Blindprobe untersucht wird, die mit einer Lasalocid-Natrium-Menge angereichert wurde, die der in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Um auf einen Gehalt von 100 mg/kg anzureichern, werden 10,0 ml der Standard-Stammlösung (3.10.1) in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben überführt und die Lösung wird auf ca. 0,5 ml eingedampft. Dann werden 50 g der Blindprobe zugegeben. Es wird gründlich gemischt, für 10 Minuten stehengelassen und nochmals mehrfach gemischt, bevor mit der Extraktion (5.2) begonnen wird.

Ist eine der zu untersuchenden Probe ähnliche Blindprobe nicht verfügbar (siehe 5.1.1), so kann ein Wiederfindungsversuch mit Hilfe des Additionsverfahrens durchgeführt werden. In diesem Fall wird die zu untersuchende Probe mit einer Lasalocid-Natrium-Menge angereichert, die der bereits in der Probe vorhandenen Menge entspricht. Diese Probe wird zusammen mit der nicht angereicherten Probe untersucht und die Wiederfindungsrate kann durch Differenzbildung ermittelt werden.

5.2. Extraktion

5.2.1. Futtermittel

Zwischen 5 und 10 g der Probe werden auf 0,01 g genau in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben mit Stopfen eingewogen und 100,0 ml angesäuertes Methanol (3.8) mit einer Pipette hinzugefügt. Der Stopfen wird lose aufgesetzt und der Inhalt zum Dispergieren geschüttelt. Der Kolben wird sodann 20 Minuten in ein Ultraschallbad (4.1) mit einer Temperatur von ca. 40 °C gestellt, dann entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Der Kolben wird etwa eine Stunde stehengelassen, bis die Schwebstoffe sich abgesetzt haben, dann wird ein Aliquot über ein 0,45-µm-Membranfilter (4.2) in ein geeignetes Gefäß filtriert. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.2.2. Vormischungen

Rund 2 g der nicht gemahlene Vormischung werden auf 0,001 g genau in einen 250-ml-Meßkolben gegeben. Es werden 100,0 ml angesäuertes Methanol (3.8) hinzugefügt und der Inhalt zum Dispergieren geschüttelt. Der Kolben wird 20 Minuten in ein Ultraschallbad (4.1) mit einer Temperatur von ca. 40 °C gestellt, dann entnommen und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Es wird mit angesäuertem Methanol (3.8) zur Marke aufgefüllt und sorgfältig gemischt. Der Kolben wird etwa eine Stunde stehengelassen, bis die Schwebstoffe sich abgesetzt haben, dann wird ein Aliquot über ein 0,45-µm-Membranfilter (4.2) filtriert. Ein Aliquot des klaren Filtrats wird mit angesäuertem Methanol (3.8) verdünnt, es soll eine Lösung mit einer Konzentration von etwa 4 µg/ml Lasalocid-Natrium erhalten werden. Diese Lösung wird für die HPLC-Bestimmung (5.3) verwendet.

5.3. HPLC-Bestimmung

5.3.1. Parameter

Die folgenden Angaben sind Richtwerte, andere Bedingungen können verwendet werden, sofern sie zu vergleichbaren Ergebnissen führen:

| | |
|--------------------------|--|
| HPLC-Trennsäule (4.3.1): | 125 mm × 4 mm, Umkehrphase C18, 5 µm |
| Mobile Phase (3.9): | Mischung aus Phosphatpufferlösung (3.7) und Methanol (3.5), 5 + 95 (V + V) |
| Flußrate: | 1,2 ml/min. |
| Fluoreszenzdetektor: | |
| — Anregungswellenlänge: | 310 nm |
| — Emissionswellenlänge: | 419 nm |
| Einspritzvolumen: | 20 µl |

Die Stabilität des chromatographischen Systems wird überprüft, indem die Kalibrierlösung (3.10.3), die 4,0 µg/ml enthält, mehrmals eingespritzt wird, bis konstante Peakhöhen (/flächen) und Retentionszeiten erhalten werden.

5.3.2. Erstellung der Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (3.10.3) wird mehrmals eingespritzt und es werden die mittleren Peakhöhen (/flächen) für die einzelnen Konzentrationen gemessen. Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, indem die mittleren Peakhöhen (/flächen) auf der Ordinate und die dazugehörigen Konzentrationen in µg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden.

5.3.3. Probenlösung

Die nach 5.2.1 bzw. 5.2.2 gewonnenen Probenextrakte werden mehrmals eingespritzt, wobei dasselbe Volumen wie für die Einspritzung der Kalibrierlösungen verwendet wird. Die mittlere Peakhöhe (/fläche) der Lasalocid-Natrium-Peaks wird ermittelt.

6. Berechnung der Ergebnisse

Aus der mittleren Peakhöhe (/fläche) der Probenlösung (5.3.3) wird anhand der Kalibrierkurve die Konzentration an Lasalocid-Natrium (µg/ml) bestimmt.

6.1. Futtermittel

Der Gehalt an Lasalocid-Natrium w in mg/kg der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

dabei ist:

β = Lasalocid-Natrium-Konzentration der Probenlösung (5.2.1) in µg/ml

V_1 = Volumen der Proben-Extraktionslösung gemäß 5.2.1 in ml (d. h. 100)

m = Probeneinwaage in g.

6.2. Vormischungen

Der Gehalt an Lasalocid-Natrium w in mg/kg der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

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

dabei ist:

β = Lasalocid-Natrium-Konzentration der Probenlösung (5.2.2) in µg/ml

V_2 = Volumen des Probenextrakts gemäß 5.2.2 in ml (d. h. 250)

f = Verdünnungsfaktor gemäß 5.2.2

m = Probeneinwaage in g.

7. Überprüfung der Ergebnisse

7.1. Identität

Nachweis- und Bestimmungsverfahren, denen die Fluoreszenzdetektion zugrunde liegt, sind im Vergleich zur UV-Detektion weniger interferenzanfällig. Die Identität des Analyten kann durch Co-Chromatographie bestätigt werden.

7.1.1. Co-Chromatographie

Ein Probenextrakt (5.2.1 oder 5.2.2) wird mit einer entsprechenden Menge Kalibrierlösung (3.10.3) aufgestockt. Die zugesetzte Lasalocid-Natrium-Menge sollte dem Lasalocid-Natrium-Gehalt des Probenextraktes entsprechen. Unter Berücksichtigung der zugesetzten Lasalocid-Natrium-Menge und der Verdünnung des Extraktes darf nur die Höhe des Lasalocid-Natrium-Peaks entsprechend vergrößert sein. Die Peakbreite in halber Höhe sollte nicht mehr als $\pm 10\%$ von der ursprünglichen Peakbreite abweichen, die sich bei dem nicht angereicherten Probenextrakt ergibt.

7.2. Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier paralleler Bestimmungen bei ein und derselben Probe darf folgende Werte nicht überschreiten:

— bei Lasalocid-Natrium-Gehalten zwischen 30 mg/kg und 100 mg/kg 15 % des höheren Resultats;

— bei Lasalocid-Natrium-Gehalten zwischen 100 mg/kg und 200 mg/kg 15 mg/kg;

— bei Lasalocid-Natrium-Gehalten von mehr als 200 mg/kg 7,5 % des höheren Resultats.

7.3. Wiederfindungsrate

Bei einer aufgestockten angereicherten (Blind-)Probe sollte die Wiederfindungsrate bei Futtermitteln mindestens 80 % betragen. Bei angereicherten Vormischungsproben sollte die Wiederfindungsrate mindestens 90 % betragen.

8. Ergebnisse eines Ringversuchs

In einem Ringversuch⁽¹⁾ wurden zwei Vormischungen (Proben 1 und 2) und fünf Futtermittel (Proben 3 bis 7) in 12 Laboratorien untersucht. Jede Probe wurde doppelt analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

⁽¹⁾ Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

| | Probe 1 Hühner- vormischung | Probe 2 Truthühner- vormischung | Probe 3 Truthühner- Pellets | Probe 4 Hühner- krümel- futter | Probe 5 Trut- hühner- futter | Probe 6 Geflügel- futter A | Probe 7 Geflügel- futter B |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| L | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| N | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 | 23 |
| Mittelwert [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 |
| Sollgehalt [mg/kg] | 5 000* | 16 000* | 80* | 105* | 120* | 50 ⁺ | 35 ⁺ |

L = Anzahl Laboratorien.

n = Anzahl Einzelwerte.

s_r = Standardabweichung der Wiederholbarkeit.

s_R = Standardabweichung der Vergleichbarkeit.

CV_r = Variationskoeffizient der Wiederholbarkeit in %.

CV_R = Variationskoeffizient der Vergleichbarkeit in %.

* Gehalt nach Angabe des Herstellers.

⁺ im Laboratorium zubereitetes Futter.