

31999L0076

1999.8.6.

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA

L 207/13

A BIZOTTSÁG 1999/76/EK IRÁNYELVE**(1999. július 23.)****a takarmányokban lévő lazalocid-nátrium meghatározására szolgáló közösségi analitikai módszer létrehozásáról****(EGT vonatkozású szöveg)**

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb Ausztria, Finnország és Svédország csatlakozási okmányával módosított, a takarmányok hatósági ellenőrzésénél alkalmazandó közösségi mintavételi és analitikai módszerek bevezetéséről szóló, 1970. július 20-i 70/373/EGK bizottsági irányelvre ⁽¹⁾ és különösen annak 2. cikkére,

- (1) mivel a 70/373/EGK irányelv előírja, hogy a takarmányok hatósági ellenőrzését, amelynek célja a takarmányok minőségére és összetételére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezésekből eredő követelmények betartásának ellenőrzése, közösségi mintavételi és analitikai módszerek alkalmazásával kell végrehajtani;
- (2) mivel a legutóbb az 1999. április 26-i 866/1999/EK bizottsági rendelettel ⁽²⁾ módosított, a takarmány-adalékanyagokról szóló, 1970. november 23-i 70/524/EGK bizottsági irányelv ⁽³⁾ előírja, hogy a lazalocid-nátrium-tartalmat fel kell tüntetni a címkézésen, amennyiben az említett anyagot az előkeverékekhez és a takarmányokhoz keverik;
- (3) mivel ezen anyagok ellenőrzésére közösségi analitikai módszereket kell meghatározni;
- (4) mivel az ebben az irányelvben előírt intézkedések összhangban vannak a Takarmányok Állandó Bizottsága véleményével,

1. cikk

A tagállamok előírják, hogy a takarmányok és az előkeverékek lazalocid-tartalmának hatósági ellenőrzése céljából végzett analitikai vizsgálatokat a mellékletében meghatározott módszerrel kell végrehajtani.

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 2000. január 31-ig hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Ezeket az intézkedéseket 2000. február 1-jétől alkalmazzák.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

3. cikk

Ez az irányelv az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő 20. napon lép hatályba.

4. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1999. július 23-án.

a Bizottság részéről

Franz FISCHLER

a Bizottság tagja

⁽¹⁾ HL L 170., 1970.8.3., 2. o.

⁽²⁾ HL L 108., 1999.4.27., 20. o.

⁽³⁾ HL L 270., 1970.12.14., 1. o.

MELLÉKLET

A LAZALOCID-NÁTRIUM MEGHATÁROZÁSA

A *Streptomyces lasaliensis* által termelt poliéter-monokarboxilsav nátriumsója

1. Cél és alkalmazási terület

A módszer a takarmányok és az előkeverékek lazalocid-nátrium-tartalmának meghatározására szolgál. A kimutatósi határérték 5 mg/kg, a mérési határérték 30 mg/kg.

2. Vizsgálati alapelv

A lazalocid-nátriumot a mintából savas metil-alkohollal extraháljuk, majd fordított fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC), spektrofotometriás detektor segítségével határozzuk meg.

3. Reagensok

3.1. Kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4)

3.2. Ortofoszforsav, w = 85 %

3.3. Ortofoszforsav oldat, σ = 20 %

Hígítsunk fel vízzel 23,5 ml ortofoszforsavat (3.2.) 100 ml-re.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetil-hexilamin), w = 99 %

3.5. Metil-alkohol, HPLC minőségű

3.6. Sósav, ρ_{20} 1,19 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3.7. Foszfátpuffer-oldat, c = 0,01 mol/l

Oldjunk fel 1,36 g KH_2PO_4 -ot (3.1.) 500 ml vízben (3.11.), adjunk hozzá 3,5 ml ortofoszforsavat (3.2.) és 10,0 ml 6-metil-2-heptilamint (3.4.). Állítsuk be a pH-t 4,0-re ortofoszforsav-oldattal (3.3.), és hígítsuk fel vízzel 1 000 ml-re (3.11.).

3.8. Savas metil-alkohol

Öntsünk 5,0 ml sósavat (3.6.) egy 1 000 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig metil-alkohollal (3.5.) és keverjük össze. Az oldatot felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

3.9. A HPLC mobil fázis, foszfátpuffer-metil-alkohol-oldat, 5 + 95 (V + V)

Keverjük össze 5 ml foszfátpuffer-oldatot (3.7.) 95 ml metil-alkohollal (3.5.).

3.10. Lazalocid-nátrium garantált tisztaságú standard anyag, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (a poliéter-monokarboxilsav nátriumsója, amelyet a *Streptomyces lasaliensis* termel), E763

3.10.1. Lazalocid-nátrium standard törzsoldat, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Mérjük be 0,1 mg-os pontossággal 50 mg lazalocid-nátriumot (3.10.) egy 100 ml-es mérőlombikba, oldjuk fel savas metil-alkoholban (3.8.), töltsük fel jelig ugyanezzel az oldószerrel, és keverjük össze. Ezt az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

3.10.2. Lazalocid-nátrium standard törzsoldat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pipetázzunk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.10.1.) egy 100 ml-es mérőlombikba, töltsük fel jelig savas metil-alkohollal (3.8.), és keverjük össze. Az oldatot használat előtt frissen kell elkészíteni.

3.10.3. Kalibráló oldatok

50 ml-es mérőlombikokba öntsünk 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, illetve 10,0 ml standard közbenső oldatot (3.10.2.). Öntsük fel jelig savas metil-alkohollal (3.8.), és keverjük össze. Ezek az oldatok egyenként 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 és 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lazalocid-nátriumnak felelnek meg. Ezeket az oldatokat felhasználás előtt frissen kell elkészíteni.

3.11. Víz, HPLC minőségű

4. Eszközök

- 4.1. Ultrahangos fürdő (vagy vízfürdős rázógép), hőmérséklet-szabályozóval
- 4.2. Membránszűrők, 0,45 µm
- 4.3. HPLC berendezés injektáló rendszerrel, 20 µl-nyi injektálási lehetőséggel.
- 4.3.1. Folyadékkromatográfiás oszlop 125 mm · 4 mm, fordított fázisú C18, 5 µm-es töltet vagy ezzel egyenértékű
- 4.3.2. Spektrofluoriméter, változtatható gerjesztési és emissziós hullámhossz-szabályozással

5. A vizsgálat módja

5.1. Általános megjegyzések

5.1.1. Vakpróba-takarmány

Vakpróba-takarmány analizálásával végezzünk visszanyerési próbát (5.1.2.) annak ellenőrzésére, hogy sem lazalocid-nátrium, sem egyéb interferáló anyag nincs jelen. A vakpróba-takarmány a mintához hasonló típusú legyen, és benne lazalocid-nátrium vagy más interferáló anyag ne legyen kimutatható.

5.1.2. Visszanyerési próba

Végezzünk visszanyerési próbát egy olyan vakpróba-takarmány analizálásával, amelyet a mintában jelenlévőhöz hasonló mennyiségű lazalocid-nátriummal dúsítottak. 100 mg/kg-os szintre történő dúsításhoz öntsünk 10,0 ml standard törzsoldatot (3.10.1.) egy 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba, és pároljuk be az oldatot kb. 0,5 ml-re. Adjunk hozzá 50 g vakpróba-takarmányt, keverjük össze alaposan, és hagyjuk 10 percig állni, majd újra keverjük többször össze, mielőtt folytatnánk a műveletet az extrahálással (5.2.).

Amennyiben a mintához hasonló típusú vakpróba-takarmány nem áll rendelkezésre (lásd 5.1.1.), a visszanyerési próbát a standard addíciós módszerrel is el lehet végezni. Ebben az esetben az analizálandó mintát a mintában már meglévővel megegyező mennyiségű lazalocid-nátriummal dúsítjuk. Ezt a mintát a nem dúsított mintával együtt analizáljuk, a visszanyerést kivonással számoljuk ki.

5.2. Extrahálás

5.2.1. Takarmányok

Mérjük be 0,01 g-os pontossággal 5–10 g mintát egy dugós, 250 ml-es Erlenmeyer-lombikba. Pipettával adjunk hozzá 100,0 ml savas metil-alkoholt (3.8.). Dugaszoljuk le lazán, és keverjük, míg diszperziót nem kapunk. Helyezzük a lombikot körülbelül 40 °C-os ultrahangos fürdőbe (4.1.) 20 percre, majd vegyük ki és hűtsük le szobahőmérsékletre. Hagyjuk állni kb. 1 óráig, amíg a szuszpendált anyag leülepszik, majd egy 0,45 µm-es membránszűrőn (4.2.) szűrjük egy aliquot részt egy megfelelő edénybe. Folytassuk a műveletet a HPLC-meghatározással (5.3.).

5.2.2. Előkeverékek

Mérjük be 0,001 g-os pontossággal 2 g öröletlen előkeveréket egy 250 ml-es mérőlombikba. Adjunk hozzá 100,0 ml savas metil-alkoholt (3.8.) és keverjük, amíg diszperziót nem kapunk. Helyezzük a mérőlombikot tartalmával együtt kb. 40 °C-os ultrahangos fürdőbe (4.1.) 20 percre, majd vegyük ki és hűtsük le szobahőmérsékletre. Hígítsuk fel savas metil-alkohollal (3.8.), és alaposan keverjük össze. Hagyjuk állni kb. 1 óráig, amíg a szuszpendált anyag leülepszik, majd egy 0,45 µm-es membránszűrőn (4.2.) szűrjük át egy aliquot részt. Hígítsuk a tiszta filtrátum megfelelő mennyiségét savas metil-alkohollal (3.8.), hogy így kb. 4 µg/ml lazalocid-nátriumot tartalmazó végső vizsgálati oldatot kepjünk. Folytassuk a műveletet a HPLC-meghatározással (5.3.).

5.3. HPLC-meghatározás

5.3.1. Paraméterek

A következő paraméterek iránymutatásul szolgálnak; más paraméterek is alkalmazhatók, feltéve hogy egyenértékű eredményeket adnak:

Folyadékkromatográfiás oszlop (4.3.1.):	125 mm · 4 mm, fordított fázisú C18, 5 µm-es töltet vagy ezzel egyenértékű
Mobil fázis (3.9.):	Foszfátpuffer-oldat (3.7.) és metil-alkohol (3.5.) keveréke, 5 + 95 (V + V)
Áramlási sebesség:	1,2 ml/perc
Detektálási hullámhosszok:	
– Gerjesztési:	310 nm
– Emissziós:	419 nm
Befecskendezett mennyiség:	20 µl

Ellenőrizzük a kromatográfiás rendszer stabilitását 4,0 µg/ml-es koncentrációjú kalibráló oldat többszöri befecskendezésével (3.10.3.), amelyet állandó csúcsmagasságok (vagy területek) és retenciós idők eléréséig folytassunk.

5.3.2. Kalibrációs görbe

Fecskendezzük be többször az egyes kalibráló oldatokat (3.10.3.), és határozzuk meg az egyes koncentrációk átlag csúcsmagasságait (területeit). Készítsük el a kalibrációs görbét úgy, hogy az átlag csúcsmagasságokat (területeket) az ordinátán, a µg/ml-ben kifejezett megfelelő koncentrációkat az abszcisszán ábrázoljuk.

5.3.3. Mintaoldat

Fecskendezzük be többször az 5.2.1. vagy 5.2.2. pont szerint nyert mintakivonatokat, ugyanakkora mennyiséget használva, mint a kalibráló oldatok esetén, és határozzuk meg a lazalocid-nátrium-csúcsok átlag csúcsmagasságait (területeit).

6. Az eredmények kiszámítása

A mintaoldat (5.3.3.) befecskendezése után kapott átlag csúcsmagasságokból (területekből), a kalibrációs görbe alapján határozzuk meg a lazalocid-nátrium koncentrációját µg/ml-ben.

6.1. Takarmányok

A minta lazalocid-nátrium-tartalma, w (mg/kg) a következő képlet szerint adható meg:

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

ahol:

β = a mintaoldat (5.2.1.) µg/ml-ben kifejezett lazalocid-nátrium koncentrációja

V_1 = a mintakivonat, 5.2.1. pont szerint ml-ben megadott (= 100) térfogata

m = a vizsgálati mennyiség g-ban kifejezett tömege

6.2. Előkeverékek

A minta lazalocid-nátrium-tartalma, w (mg/kg) a következő képlet szerint adható meg:

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

ahol:

β = a mintaoldat (5.2.2.) µg/ml-ben megadott lazalocid-nátrium koncentrációja

V_2 = a mintakivonat 5.2.2. pont szerint ml-ben megadott (= 250) térfogata

f = az 5.2.2. pont szerinti hígítási tényező

7. Az eredmények validálása

7.1. Azonosság

A spektro-fluorimetrián alapuló módszerek kevésbé érzékenyek az interferenciára, mint azok az eljárások, amelyek során UV detektort használnak. Az analizált anyag azonossága párhuzamos kromatográfiával ellenőrizhető.

7.1.1. Párhuzamos kromatográfia

Egy mintakivonatot (5.2.1. vagy 5.2.2.) megfelelő mennyiségű kalibráló oldat (3.10.3.) hozzáadásával dúsítunk. A hozzáadott lazalocid-nátrium mennyisége közel azonos legyen a mintaoldatban található lazalocid-nátrium mennyiségével. A hozzáadott lazalocid-nátrium mennyiségét és a kivonat hígulását tekintve csak a lazalocid-nátrium csúcsmagassága növekedhet. A csúcshélesség a magasság felénél nem haladhatja meg a nem dúsított mintakivonat eredeti csúcshélességének $\pm 10\%$ -át.

7.2. Ismételtelőség

Az ugyanazon a mintán elvégzett két párhuzamos meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg:

- a magasabb érték 15 %-át, 30–100 mg/kg közötti lazalocid-nátrium-tartalom esetén,
- a 15 mg/kg értéket, a 100–200 mg/kg közötti lazalocid-nátrium-tartalom esetén,
- a magasabb érték 7,5 %-át, a 200 mg/kg-nál nagyobb lazalocid-nátrium-tartalom esetén.

7.3. Visszanyerés

A dúsított (vakpróba) takarmányminta esetében a visszanyerés foka legalább 80 %-os legyen. A dúsított előkeverék-minták esetében a visszanyerés foka legalább 90 %-os legyen.

8. Kollaborációs vizsgálat eredményei

Kollaborációs vizsgálat⁽¹⁾ keretében 12 laboratórium 2 előkeveréket (1. és 2. minta) és 5 takarmányt (3–7. minta) analizáltak. Minden egyes mintán kettős analízist végeztek. Az eredményeket a következő táblázat tartalmazza:

(1) Analyst, 1995., 120., 2175–2180. o.

	1. minta Csirke előkeverék	2. minta Pulyka előke- verék	3. minta Pulyka pellet	4. minta Csirke derce	5. minta Pulyka takar- mány	6. minta Baromfi A-takar- mány	7. minta Baromfi B-takar- mány
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Átlag (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
Névleges tartalom (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (*)	35 (*)

L = a laboratóriumok száma

n = az egyedi értékek száma

S_r = az ismételtetés szórása

S_R = a reprodukálhatóság szórása

CV_r = az ismételtetés variációs koefficiense %

CV_R = a reprodukálhatóság variációs koefficiense %

(*) a gyártó által megadott tartalom

(†) a laboratóriumban készített táp