

31999L0076

1999 8 6

EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS

L 207/13

KOMISIJOS DIREKTYVA 1999/76/EB**1999 m. liepos 23 d.****nustatanti Bendrijos analizės metodą, kuriuo nustatoma lasalocido natrio druska pašaruose****(tekstas svarbus EEE)**

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

2 straipsnis

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų oficialiai pašarų kontrolei, įvedimo⁽¹⁾ su paskutiniaisiais pakeitimais, padarytais Austrijos, Suomijos ir Švedijos stojimo aktu, ypač į jos 2 straipsnį,

Valstybės narės priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie, įsigalioję ne vėliau kaip iki 2000 m. sausio 31 d., įgyvendina šią direktyvą. Apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

Šias priemones jos taiko nuo 2000 m. vasario 1 d.

(1) kadangi Direktyva 70/373/EEB nustato, kad oficiali pašarų kontrolė siekiant patikrinti, kaip laikomasi pašarų kokybės ir sudėties reikalavimų, nustatytų įstatymais ir kitais teisės aktais, turi būti vykdoma taikant Bendrijos bandinių ėmimo ir analizės metodus;

Valstybės narės, tvirtindamos šias priemones, daro jose nuorodą į šią direktyvą arba tokia nuoroda daroma jas oficialiai skelbiant. Nuorodos darymo tvarką nustato valstybės narės.

(2) kadangi 1970 m. lapkričio 23 d. Tarybos direktyva 70/524/EEB dėl pašarų priedų⁽²⁾ su paskutiniaisiais pakeitimais, padarytais 1999 m. balandžio 26 d. Komisijos reglamentu (EB) Nr. 866/1999⁽³⁾, nustato, kad lasalocido natrio druskos kiekis turi būti nurodytas etiketėse, jei šios medžiagos dedamos į premiksus ir pašarus;

3 straipsnis

Ši direktyva įsigalioja dvidešimtą dieną po jos paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

(3) kadangi šioms medžiagoms nustatyti turi būti nustatyti Bendrijos analizės metodai;

4 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

(4) šioje direktyvoje numatytos priemonės atitinka Pašarų nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

Priimta Briuselyje, 1999 m. liepos 23 d.

1 straipsnis

Valstybės narės numato, kad siekiant oficialiai kontroliuoti lasalocido kiekį pašaruose, atliekamos analizės būtų vykdomos taikant šios direktyvos priede nustatytą metodą.

Komisijos vardu

Franz FISCHLER

Komisijos narys

⁽¹⁾ OL L 170, 1970 8 3, p. 2.⁽²⁾ OL L 270, 1970 12 14, p. 1.⁽³⁾ OL L 108, 1999 4 27, p. 20.

PRIEDAS

LASALOCIDO NATRIO DRUSKOS NUSTATYMAS

Iš *Streptomyces lasaliensis* kultūros gautos polieterio monokarboninės rūgšties natrio druska

1. Tikslas ir taikymo sritis

Šiuo metodu nustatomas lasalocido natrio druskos kiekis pašaruose ir premiksuose. Radimo riba yra 5 mg/kg, nustatymo riba – 30 mg/kg.

2. Metodo esmė

Lasalocido natrio druska ekstrahuojama iš mėginio į parūgštintą metanolį, o jos kiekis nustatomas atvirkštinių fazių didelio efektyvumo skysčių chromatografijos (HPLC) metodu naudojant spektrofлуorimetrinį detektorių.

3. Reagentai

3.1. Kalio-divandenilio fosfatas (KH_2PO_4)

3.2. Ortofosforo rūgštis, w = 85 %

3.3. Ortofosforo rūgšties tirpalas, $\sigma = 20 \%$

23,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2) skiesti vandeniu iki 100 ml

3.4. 6-metil-2-heptilaminas (1,5-dimetilheksilaminas), w = 99 %

3.5. Metanolis, chromatografiškai grynas

3.6. Druskos rūgštis, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$

3.7. Fosfatinis buferinis tirpalas, c = 0,01 mol/l

500 ml vandens (3.11) ištirpinti 1,36 g KH_2PO_4 (3.1), įpilti 3,5 ml ortofosforo rūgšties (3.2) ir 10,0 ml 6-metil-2-heptilamino (3.4). Ortofosforo rūgštimi (3.3) tirpalo pH nustatyti iki 4,0, vandeniu (3.11) skiesti iki 1000 ml.

3.8. Parūgštintas metanolis

Į 1 000 ml matavimo kolbą įpilti 5,0 ml druskos rūgšties (3.6), iki žymos skiesti metanoliumi (3.5) ir išmaišyti. Šį tirpalą gaminti analizės dieną prieš naudojimą.

3.9. HPLC judančioji fazė, fosfatinis buferinis tirpalas/metanolis santykiu 5 + 95 (V + V)

5 ml fosfatinio buferinio tirpalo (3.7) sumaišyti su 95 ml metanolio (3.5).

3.10. Etalonė medžiaga – gryna lasalocido natrio druska, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (polieterio monokarboninės rūgšties natrio druska, gauta iš *Streptomyces lasaliensis* kultūros), E763

3.10.1. Lasalocido natrio druskos pradinis etaloninis tirpalas, 500 $\mu\text{g/ml}$

Į 100 ml matavimo kolbą 0,1 mg tikslumu pasverti 50 mg lasalocido natrio druskos (3.10), ištirpinti parūgštintame metanolyje (3.8), iki žymos skiesti tuo pačiu tirpikliu ir išmaišyti. Šis tirpalas gaminamas analizės dieną prieš naudojimą.

3.10.2. lasalocido natrio druskos tarpinis etaloninis tirpalas, 50 $\mu\text{g/ml}$

Į 100 ml matavimo kolbą pipete įlašinti 10 ml lasalocido natrio druskos pradinio etaloninio tirpalo (3.10.1), iki žymos skiesti parūgštintu metanoliumi (3.8) ir išmaišyti. Šis tirpalas gaminamas analizės dieną prieš naudojimą.

3.10.3. Kalibravimo tirpalai

Į 50 ml matavimo kolbas įpilti 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 ir 10,0 ml tarpinio etaloninio tirpalo (3.10.2), iki žymos skiesti parūgštintu metanoliumi (3.8) ir išmaišyti. Lasalocido natrio druskos koncentracija šiuose tirpaluose yra atitinkamai 1,0 $\mu\text{g/ml}$, 2,0 $\mu\text{g/ml}$, 4,0 $\mu\text{g/ml}$, 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ir 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Šie tirpalai gaminami analizės dieną prieš naudojimą.

3.11. Vanduo, chromatografiškai grynas

4. Įranga

- 4.1. Ultragarso vonia (arba vandens vonia su maišykle) su reguliuojama temperatūra.
- 4.2. Membraninis filtras, 0,45 µm.
- 4.3. HPLC įranga su išvirkštimo sistema, tinkama išvirkšti 20 µl tirpalo
- 4.3.1. Atvirkštinių fazių skysčių chromatografijos kolonėlė 125 mm × 4 mm, C18, 5 µm pakuotė ar lygiavertė kolonėlė
- 4.3.2. Reguliuojamo bangos ilgio spektrofluorimetrinis detektorius.

5. Darbo eiga

5.1. Bendrosios nuostatos

5.1.1. Tuščiasis pašaras

Regeneravimo testui (5.1.2) atlikti turėtų būti tiriamas tuščiasis pašaras siekiant patikrinti, ar jame nėra lasalocido natrio druskos ar kitų medžiagų. Tuščiasis pašaras turėtų būti panašios rūšies kaip tiriamasis ir jame neturi būti nei lasalocido natrio druskos, nei kitų medžiagų.

5.1.2. Regeneravimo testas

Regeneravimo testas turėtų būti atliekamas įdėjus į tuščiąjį pašarą lasalocido natrio druskos kiekį, panašų į esantį mėginyje. Siekiant gauti koncentraciją 100 mg/kg, į 250 ml kūginę kolbą įpilti 10,0 ml pradinio etaloninio tirpalo (3.10.1) ir tirpalą išgarinti iki maždaug 0,5 ml. Įdėti 50 g tuščiojo pašaro, gerai išmaišyti ir palikti 10 min. Prieš ekstrahavimą (5.2) dar keletą kartų pamaišyti.

Jei nėra tuščiojo pašaro, panašaus į tiriamąjį (žr. 5.1.1), regeneravimo testas gali būti atliekamas etaloninio priedo metodu. Šiuo atveju į tiriamąjį mėginį dedamas panašus lasalocido natrio druskos kiekis, koks jau yra mėginyje. Mėginys su lasalocido natrio druskos priedu ir neprisodrintas mėginys ištiriami. Regeneravimas gali būti apskaičiuojama atimties būdu.

5.2. Ekstrahavimas

5.2.1. Pašarai

Į 250 ml kūginę kolbą su kamščiu 0,01 g tikslumu pasverti 5–10 g mėginio. Įpilti 100 ml parūgštinto metanolio (3.8). Kolbą uždengti kamščiu ir pakratyti, kad vienodai išsimaišytų mėginys. Kolbą 20 min. įdėti į ultragarso vonią (4.1), kurioje nustatyta maždaug 40 °C temperatūra. Iš ultragarso vonios išimtą kolbą atvėsinti iki kambario temperatūros. Kolbą palikti apytiksliai 1 val., kol nusistovės skenda. Alikvotinę ekstrakto dalį filtruoti per membranineį filtrą (4.2) į tinkamą indą. Atlikti nustatymą HPLC metodu (5.3).

5.2.2. Premiksai

Į 250 ml matavimo kolbą 0,001 g tikslumu pasverti apie 2 g nemalto premikso. Įpilti 100 ml parūgštinto metanolio (3.8). Kolbą pakratyti, kad vienodai išsimaišytų mėginys. Kolbą 20 min. įdėti į ultragarso vonią (4.1), kurioje nustatyta maždaug 40 °C temperatūra. Iš ultragarso vonios išimtą kolbą atvėsinti iki kambario temperatūros. Iki žymos skiesti parūgštintu metanolio (3.8) ir nuodugnai išmaišyti. Kolbą palikti apytiksliai 1 val., kol nusistovės skenda. Alikvotinę ekstrakto dalį filtruoti per membranineį filtrą (4.2). Tinkamą filtrato kiekį skiesti parūgštintu metanolio (3.8), kad lasalocido natrio druskos koncentracija galutiniame tirpale būtų apie 4 µg/ml. Atlikti nustatymą HPLC metodu (5.3).

5.3. Nustatymas HPLC metodu:

5.3.1. Parametrai

Rekomenduojamos šios sąlygos; galima taikyti kitas sąlygas, jei gaunami lygiaverčiai rezultatai:

Skysčių chromatografijos kolonėlė (4.3.1):	125 mm × 4 mm, atvirkštinių fazių, C18, 5 µm pakuotė, ar lygiavertė
Judančioji fazė (3.9):	fosfatinio buferinio tirpalo (3.7) ir metanolio (3.5) mišinys 5 + 95 (v + v)
Srautas:	1,2 ml/min.
Matavimo bangos ilgis:	
— sužadınimas:	310 nm,
— emisija:	419 nm
Išvirkščiamo mėginio tūris:	20 µl

Chromatografinės sistemos stabilumą patikrinti keletą kartų išvirkščiant 4,0 µg/ml kalibravimo tirpalą (3.10.3), kol smailės aukštis ir sulaikymo trukmė nesikeis.

5.3.2. Kalibravimo kreivė

Po keletą kartų išvirkšti kiekvieną kalibravimo tirpalą (3.10.3) ir išmatuoti kiekvienos koncentracijos smailių aukščių (plotų) vidurkius. Nubraižyti kalibravimo kreivę ant ordinačių ašies atidedant kalibravimo tirpalų smailių aukščių (plotų) vidurkius, ant abscisių – atitinkamų tirpalų koncentracijas mikrogramais mililitre.

5.3.3. Mėginio tirpalas

Mėginio ekstraktas (5.2.1 ar 5.2.2) tokio pat tūrio, kaip ir kalibravimo tirpalų tūriai, išvirkšti keletą kartų į chromatografą, bei išmatuoti lasalocido natrio druskos smailių aukščių (plotų) vidurkį.

6. Rezultatų apskaičiavimas

Pagal mėginio tirpalo lasalocido natrio druskos smailių aukščių (plotų) vidurkį (5.3.3), remiantis kalibravimo kreive, nustatyti mėginio tirpalo koncentraciją mikromoliais mililitre.

6.1. Pašarai

Lasalocido kiekis w miligramais kilograme mėginio apskaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

kurioje:

β — lasalocido natrio druskos koncentracija mėginio tirpale (5.2.1) mikrogramais mililitre;

V_1 — mėginio ekstrakto tūris mililitrais pagal 5.2.1 punktą (t. y. 100 ml);

m — mėginio masė g.

6.2. Premiksai

Lasalocido natrio druskos kiekis w miligramais kilograme mėginio apskaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

kurioje:

β — lasalocido natrio druskos koncentracija mėginio tirpale (5.2.2) mikrogramais mililitre;

V_2 — mėginio ekstrakto tūris mililitrais pagal 5.2.2 punktą (t. y. 250 ml);

f — praskiedimo faktorius pagal 5.2.2 punktą;

m — mėginio masė g.

7. Rezultatų patvirtinimas

7.1. Tapatumas

Spektrofluorimetrija pagrįsti metodai yra mažiau priklausomi nuo trukdžių nei tie, kuriuose naudojama UV detekcija. Analitės tapatumas gali būti patvirtintas kochromatografijos būdu.

7.1.1. Kochromatografija

Mėginio ekstraktas (5.2.1 ar 5.2.2) prisodrinamas kalibravimo tirpalo (3.10.3) kiekiu. Dedamo lasalocido natrio druskos kiekis turėtų būti panašus į išmatuotą lasalocido natrio druskos kiekį mėginio ekstrakto. Atsižvelgiant į įdėtą kiekį ir į ekstrakto praskiedimą, padidėti turėtų tik lasalocido natrio druskos smailės aukštis. Smailės plotis pusėje jos aukščio turėtų būti $\pm 10\%$ neprisodrinto mėginio ekstrakto lasalocido natrio druskos smailės pločio.

7.2. Pakartojamumas

Skirtumas tarp dviejų kartotinių to paties mėginio matavimų rezultatų neturi viršyti:

— 15 % santykinai didesnės vertės, kai lasalocido natrio druskos koncentracija yra nuo 30 mg/kg iki 100 mg/kg,

— 15 mg/kg, kai lasalocido natrio druskos yra nuo 100 mg/kg iki 200 mg/kg,

— 7,5 % santykinai didesnės vertės, kai lasalocido natrio druskos koncentracija yra per 200 mg/kg.

7.3. Regeneravimas

Prisodrinto (tuščiojo) pašarų mėginio regeneravimas turėtų būti ne mažesnis kaip 80 %. Prisodrintų premikso mėginių regeneravimas turi būti ne mažesnis kaip 90 %.

8. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai

Buvo parengtas tarplaboratorinis tyrimas⁽¹⁾, kurio metu 12 laboratorijų analizavo du premiksus (1 ir 2 mėginiai) ir penkis pašarus (3–7 mėginiai). Kiekvienas mėginys iširtas du kartus. Rezultatai pateikiami lentelėje.

(1) ANALYST, 1995, 120, 2175-2180

	1 mėginys Premixas viščiukams	2 mėginys Premixas kalakutams	3 mėginys Granu- liuotas lesalas kala- kutams	4 mėginys Trupininis lesalas viščiukams	5 mėginys Lesalas kala- kutams	6 mėginys Lesalas paukščiams A	7 mėginys Lesalas paukščiams B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Vidurkis (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
Nominalus kiekis (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (†)	35 (†)

L = laboratorijų skaičius;

n = atskirų verčių skaičius;

S_r = pakartojamumo standartinis nuokrypis;

CV_r = pakartojamumo variacijos koeficientas %;

S_R = atkuriamumo etaloninis nuokrypis;

CV_R = atkuriamumo variacijos koeficientas %.

(*) gamintojo deklaruotas lasalocido natrio druskos kiekis;

(†) laboratorijoje pagamintas pašaras.