

31999L0076

6.8.1999

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 207/13

DYREKTYWA KOMISJI 1999/76/WE
z dnia 23 lipca 1999 r.
ustanawiająca wspólnotową metodę analizy dla oznaczania lasalocidu soli sodowej w paszach
(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz⁽¹⁾, ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia Austrii, Finlandii i Szwecji, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dyrektywa 70/373/EWG zastrzega, że urzędowe kontrole pasz do celu sprawdzenia zgodności z wymogami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych, regulujących ich jakość i skład muszą być przeprowadzane wykorzystując wspólnotowe metody pobierania próbek i przeprowadzania analiz.
- (2) Dyrektywa Rady 70/524/EWG z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych⁽²⁾, ostatnio zmieniona rozporządzeniem Komisji (WE) nr 866/1999 z dnia 26 kwietnia 1999 r.⁽³⁾, zastrzega, że zawartość lasalocidu soli sodowej musi być wskazana na etykiecie, dodana przypadkowo gdy te substancje są dodawane do premiksów i pasz.
- (3) Należy ustanowić wspólnotowe metody analiz, w celu umożliwienia kontrolowania tych substancji.
- (4) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

Artykuł 1

Państwa Członkowskie zapewniają, aby analizy przeprowadzane w celu urzędowych kontroli zawartości lasalocidu soli sodowej w paszach i premiksach przeprowadzane były z wykorzystaniem metody określonej w załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy nie później niż do dnia 31 stycznia 2000 r. Niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Państwa Członkowskie stosują te przepisy od dnia 1 lutego 2000 r.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Procedury dokonywania takiego odniesienia określone są przez Państwa Członkowskie.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 23 lipca 1999 r.

W imieniu Komisji

Franz FISCHLER

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

⁽²⁾ Dz.U. L 270 z 14.12.1970, str. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 108 z 27.4.1999, str. 20.

ZAŁĄCZNIK

OZNACZANIE LASALOCIDU SOLI SODOWEJ

Sól sodowa polimeru kwasu monokarbokrylowego wytworzonego przez *Streptomyces lasaliensis*

1. Cel i zakres

Niniejsza metoda służy oznaczaniu lasalocidu soli sodowej w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 5 mg/kg, granica oznaczania wynosi 30 mg/kg.

2. Zasada

Lasalocid sól sodowa jest ekstrahowana z próbki do zakwaszonego metanolu i oznaczana przez odwrotną fazę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) poprzez użycie detektora spektrofotometrycznego.

3. Odczynniki

3.1. Diwodoro(orto)fosforan potasu (KH_2PO_4)

3.2. Kwas ortofosforowy, w = 85 %

3.3. Roztwór kwasu ortofosforowego, $\sigma = 20$ %

Rozcieńczyć 23,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) wodą do objętości 100 ml.

3.4. 6-metylo-2-heptyloamina (1,5-dimetyloheksylamina), w = 99 %

3.5. Metanol, klasa wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

3.6. Kwas solny, $\rho_{20} 1,19$ g/ml

3.7. Roztwór buforowy fosforanu, c = 0,01 mol/l

Rozpuścić 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) w 500 ml wody (3.11), dodać 3,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) i 10,0 ml 6-metyl-2-heptyloaminy (3.4). Doprowadzić odczyn pH do wartości 4,0 roztworem kwasu ortofosforowego (3.3) i rozcieńczyć wodą (3.11) do objętości 1000 ml.

3.8. Zakwaszony metanol

Przenieść 5,0 ml kwasu solnego (3.6) do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, dopełnić do oznaczenia metanolem (3.5) i wymieszać. Roztwór ten należy sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC, buforowy roztwór fosforanu i metanolu 5 + 95 (V + V)

Zmieszać 5 ml buforowego roztworu fosforanu (3.7) z 95 ml metanolu (3.5).

3.10. Podstawowa substancja lasalocidu soli sodowej o gwarantowanej czystości, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sól sodowa polimeru kwasu monokarboksyłowego wytworzona przez *streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Podstawowy roztwór mianowany lasalocidu soli sodowej, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Odważyć 50 mg lasalocidu soli sodowej z dokładnością do 0,1 mg (3.10), do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.8) dopełnić do oznaczenia tym samym rozpuszczalnikiem i wymieszać. Niniejszy roztwór należy sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.10.2. Pośredni roztwór mianowany lasalocidu soli sodowej, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pobrać pipetą 10,0 ml podstawowego roztworu mianowanego lasalocidu soli sodowej (3.10.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, dopełnić do oznaczenia zakwaszonym metanolem (3.8) i wymieszać. Niniejszy roztwór należy sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.10.3. Roztwory wzorcowe

Do szeregu kolb wzorcowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 4,0 5,0 oraz 10,0 ml pośredniego roztworu mianowanego (3.10.2). Dopełnić do oznaczenia zakwaszonym metanolem (3.8) i wymieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,0 2,0 4,0 5,0 i 10,0 μg lasalocidu soli sodowej na ml. Roztwory te muszą być sporządzane bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Woda, stopień HPLC

4. Aparatura

- 4.1. Łaźnia ultradźwiękowa (lub wstrząsana łaźnia wodna) z kontrolą temperatury
- 4.2. Filtry membranowe, 0,45 µm
- 4.3. Sprzęt do wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z systemem wtryskowym, odpowiednim do wtryskiwania jednostek o pojemności 20 µl.
- 4.3.1. Płynna kolumna chromatograficzna, 125 mm x 4 mm, chromatografia podziałowa z odwróconą fazą C18 o wypełnieniu 5 µm lub równoważnym
- 4.3.2. Spektrofluorymetr z możliwością zmiany długości fal wzbudzenia i emisji

5. Procedura

5.1. Ogólne

5.1.1. Próba ślepa

Do celów przeprowadzenia testu odzysku (5.1.2) powinna zostać przeprowadzona analiza ślepej próby w celu upewnienia się, czy nie występuje w niej ani lasalocid soli sodowej ani substancje przeszkadzające. Próba ślepa powinna być podobna pod względem rodzaju do próbki i nie powinna zostać wykryta obecność lasalocidu soli sodowej ani substancji przeszkadzających.

5.1.2. Test odzysku

Test odzysku powinien być przeprowadzany przez analizę próby ślepej, która została wzmocniona przez dodanie określonej ilości lasalocidu soli sodowej, podobnej do tej, która znajduje się w próbce. W celu wzmocnienia na poziomie 100 mg/kg, przekazać 10,0 ml roztworu mianowanego (3.10.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut, mieszając kilkakrotnie przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Alternatywnie, jeśli nie jest dostępna próba ślepa podobna pod względem rodzaju nie do próbki (patrz: 5.1.10), test odzysku można przeprowadzić środkami metody dodawania wzorca. W tym przypadku, próbka, która ma zostać poddana analizie jest wzmocniana lasalocidem solą sodową, w ilości podobnej do tej zawartej w próbce. Niniejsza próbka jest analizowana razem z próbką niewzmocnioną, a odzysk oblicza się przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze

Odważyć z dokładnością do 0,01 g od 5 g do 10 g próbki, do w kolby stożkowej o pojemności 250 ml z korkiem. Dodać pipetą 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.8), zamknąć lekko korkiem i zawirować do rozproszenia. Umieścić kolbę w kąpeli ultradźwiękowej (4.1), w temperaturze około 40 °C, na 20 minut, wyciągnąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Odstawić na godzinę, do momentu osadzenia się zawiesiny, następnie przefiltrować podwielokrotną część próbki przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2) do odpowiedniego naczynia. Następnie przejść do oznaczenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć z dokładnością do 0,001 g ok. 2 g premiksu, do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.8) i zawirować do rozproszenia. Umieścić kolbę wraz z jej zawartością w kąpeli ultradźwiękowej (4.1), w temperaturze około 40 °C, na 20 minut, wyciągnąć i schłodzić do temperatury pokojowej, Rozcieńczyć w zakwaszonym metanolu do oznaczenia (3.8) i dobrze wymieszać. Odstawić na godzinę, do momentu osadzenia się zawiesiny, następnie przefiltrować podwielokrotną część próbki przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2). Rozcieńczyć odpowiednią ilość oczyszczonego filtratu zakwaszonym metanolem (3.8), aby uzyskać ostateczny roztwór analityczny, zawierający około 4 µg/ml lasalocidu soli sodowej. Następnie przejść do oznaczenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (5.3).

5.3. Oznaczanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

5.3.1. Parametry

W celach orientacyjnych proponuje się zachowanie następujących warunków; można też stosować inne warunki, o ile dają one takie same wyniki:

Płynna kolumna chromatograficzna (4.3.1):	125 mm x 4 mm, odwrócona faza C18, 5 µm wypełnienia lub równoważnik
Faza ruchoma (3.9):	Mieszanina roztworu buforowego fosforanu (3.7) i metanolu (3.5) 5 + 95 (V + V)
Szybkość przepływu:	1,2 ml/min
Detekcja długości fal:	
– Wzbudzenie:	310 nm
– Emisja:	419 nm
Objętość wtrysku:	20 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, wtryskując w tym celu kilkakrotnie roztwór wzorcowy (3.10.3) zawierający 4,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (lub powierzchni) pików i czasu retencji.

5.3.2. Krzywa wzorcowa

Wtryskiwać kilkakrotnie każdy roztwór wzorcowy (3.10.3) i oznaczyć średnie wysokości pików (powierzchnie) dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą wzorcową wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów wzorcowych jako rzędnych i odpowiadających im stężeń, w µg/ml, jako odciętych.

5.3.3. Roztwór próbny

Wtryskiwać kilkakrotnie ekstrakty uzyskane w 5.2.1 lub 5.2.2, wykorzystując taką samą objętość jak przyjętą dla roztworów wzorcowych i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla lasalocidu soli sodowej.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średnich wysokości pików (powierzchni), wytworzonych przez wtrysnięcie roztworu próbnego (5.3.3), określić stężenie lasalocidu soli sodowej (µg/ml) przez porównanie z krzywą wzorcową.

6.1. Pasze

Zawartość lasalocidu soli sodowej, w (mg/kg), w próbce oblicza się przy pomocy następującego wzoru:

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

gdzie:

β = stężenie lasalocidu soli sodowej w roztworze próbnym (5.2.1), w µg/ml

V_1 = objętość ekstraktu próbki zgodnie z 5.2.1 w ml (tj. 100)

m = masa porcji próbnej, w gramach

6.2. Premiksy

Zawartość lasalocidu soli sodowej, w (mg/kg), w próbce oblicza się przy pomocy następującego wzoru:

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

gdzie:

β = stężenie lasalocidu-soli sodowej w roztworze próbnym (5.2.1), w µg/ml

V_2 = objętość ekstraktu próbki zgodnie z 5.2.2, w ml (tj. 250)

f = współczynnik rozcieńczenia, zgodnie z 5.2.2 m = masa porcji próbnej, w gramach

7. Ocena poprawności wyników

7.1. Tożsamość

Metody oparte o spektrofлуorymetrię są mniej podatne na zakłócenia niż te, w których używa się detekcji promieni UV. Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Do ekstraktu próbki (5.2.1 lub 5.2.2) dodaje się odpowiednią ilość roztworu wzorcowego (3.10.3). Ilość dodanego lasalocidu soli sodowej powinna być zbliżona do ilości lasalocidu soli sodowej znajdującej się w ekstrakcie próbki. Jedynie wysokość pików lasalocidu soli sodowej powinna być wzmocniona do rozmiaru opartego na dodanej ilości lasalocidu soli sodowej i rozpuszczeniu ekstraktu. Szerokość pików, w połowie wysokości, musi się mieścić między ± 10 % pierwotnej szerokości pików niewzmocnionego ekstraktu próbki.

7.2. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń przeprowadzonych na tej samej próbce nie może przekraczać:

— 15 % względem większej zawartości lasalocidu soli sodowej, od 30 mg/kg do 100 mg/kg,

— 15 mg/kg względem zawartości lasalocidu soli sodowej, od 100 mg/kg do 200 mg/kg,

— 7,5 % względem większej zawartości lasalocidu soli sodowej, powyżej 200 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku próbki wzmocnionej (ślepej) odzysk powinien wynosić co najmniej 80 %. W przypadku próbki wzmocnionej premiksu (ślepej), odzysk powinien wynosić co najmniej 90 %.

8. Wyniki badań zbiorowych

Zorganizowano badanie zbiorowe, w ramach którego we współpracy z dwunastoma innymi laboratoriami⁽¹⁾, przeprowadzono analizę 2 premiksów (próbki 1 i 2) oraz 5 pasz (próbki 3–7). Przeprowadzono analizę każdej próbki dwukrotnie. Wyniki są zamieszczone w poniższej tabeli:

(1) Analityk, 1995 r., 120, 2175–2180.

	Próbka 1 Premiks dla kurczaków	Próbka 2 Premiks dla indyków	Próbka 3 Granulki dla indyków	Próbka 4 Okruchy dla kurczaków	Próbka 5 Pasza dla indyków	Próbka 6 Pasza dla drobiu	Próbka 7 Pasza dla drobiu
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Średnio (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
Sr (mg/mg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
Cvr (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
SR (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CVR (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Zawartość nominalna (mg/kg)	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (+)	35 (+)

L = liczba laboratoriów

N = liczba poszczególnych wyników

Sr = standardowe odchylenie powtarzalności

SR = standardowe odchylenie odtwarzalności wyników

Cvr = odchylenie standardowe zmienne powtarzalności, %

CVR = odchylenie standardowe zmienne odtwarzalności, %

(*) zawartość zadeklarowana przez producenta

(+) pasza przygotowana w laboratorium