

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 1999/76/EB

2001/EES/46/16

frá 23. júlí 1999

um að taka upp í bandalaginu greiningaraðferðir til að ákvarða lasalósiðnatríum í fódri(*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 70/373/EBE frá 20. júlí 1970 um að taka upp í bandalaginu aðferðir við sýnatöku og greiningu vegna opinbers eftirlits með fódri⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með lögunum um aðild Austurríkis, Finnlands og Svíþjóðar, einkum 2. gr,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Í tilskipun 70/373/EBE er mælt fyrir um að við opinbert eftirlit með fódri, sem fer fram í því skyni að kanna hvort kröfum laga og stjórnsýslufyrirmæla, sem fjalla um eiginleika þess og samsetningu, sé fullnægt, skuli beita bandalagsaðferðum við sýnatöku og greiningu.
- 2) Tilskipun ráðsins 70/524/EBE frá 23. nóvember 1970 um aukefni í fódri⁽²⁾, eins og henni var síðast breytt með reglugerð ráðsins (EB) nr. 866/1999 frá 26. apríl 1999⁽³⁾ mælir fyrir um að innihald lasalósiðnatríums skuli tilgreint á merkimiða ef þessum efnunum er bætt í forblöndur og fóður.
- 3) Fastsetja ber greiningaraðferðir bandalagsins til þess að unnt sé að hafa eftirlit með þessum efnunum.
- 4) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari tilskipun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um fóður.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

I. gr.

Aðildarríkin skulu kveða á um að greiningar vegna opinbers eftirlits með innihaldi lasalósiðnatríums í fódri og for-

blöndum, fari fram samkvæmt þeim aðferðum sem mælt er fyrir um í viðaukanum við þessa tilskipun.

2. gr.

Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að ákvæðum þessarar tilskipunar eigi síðar en 31. janúar 2000. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.

Þau skulu beita þessum ráðstöfunum frá 1. febrúar 2000.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessar ráðstafanir skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun þegar þær eru birtar opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

3. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 23. júlí 1999.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Franz FISCHLER

framkvæmdastjóri.

(*) Þessi EB-gerð, sem birtist í Stjtið. EB L 207, 6.8.1999, bls. 13, var nefnd í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 71/2000 frá 2. október 2000 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn. Sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópubandalaganna nr. 59, 14.12.2000, bls. 1.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 170, 3.8.1970, bls. 2.

⁽²⁾ Stjtið. EB L 270, 14.12.1970, bls. 1.

⁽³⁾ Stjtið. EB L 108, 27.4.1999, bls. 20.

VIDAUKI

ÁKVÖRÐUN LASALÓSÍÐNATRÍUMS

Natríumsalt pólýetramónókarboxýlsýru sem framleidd er af *Streptomyces lasaliensis*

1. Tilgangur og gildissvið

Aðferðin er notuð til að ákvarða lasalósíðnatríum í fódri og forblöndum. Greiningarmörk eru 5 mg/kg, ákvörðunarmörk eru 30 mg/kg.

2. Meginregla

Lasalósíðnatríum er dregið út úr sýninu með sýrðu metanóli og ákvarðað með hágæðavökvaskiljun (HPLC) með umbreyttum (vatnsfælnum) fastfasa og flúrskinsnema.

3. Prófunarefni

3.1. Kalíumtívetnisfosfat (KH_2PO_4)

3.2. Orþófosfórsýra, w = 85%

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

23,5 ml af orþófosfórsýru (3.2) eru þynntir með vatni upp í 100 ml.

3.4. 6-metýl-2-heptýlamín (1,5-dímetylhexýlamín), w = 99%

3.5. Metanól, af hreinleika sem krafist er í hágæðavökvaskiljun

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

3.7. Fosfatjafnalausn, c = 0,01 mól/l

1,36 g af KH_2PO_4 (3.1) eru leyst upp í 500 ml af vatni (3.11), 3,5 ml af orþófosfórsýru (3.2) og 10,0 ml af 6-metýl-2-heptýlamíni (3.4) er bætt út í. Sýrustig er stillt af við 4,0 með orþófosfórsýrulausninni (3.3) og þynnt með vatni (3.11) upp í 1000 ml.

3.8. Sýrt metanól

5,0 ml af saltsýru (3.6) eru færðir í 1000 ml mæliflösku, fyllt upp að kvarðamerkinu með metanóli (3.5) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.9. Ferðafasi fyrir hágæðavökvaskiljun, fosfatjafnametanóllausn 5 + 95 (V + V)

5 ml af fosfatjafnalausn (3.7) og 95 ml af metanóli (3.5) er blandað saman.

3.10. Lasalósíðnatríum staðalefni með tryggðum hreinleika $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natríumsalt pólýetramónókarboxýlsýru sem framleidd er af *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Staðalstofnlausn lasalósíðnatríums (geymslulausn), 500 $\mu\text{g/ml}$

50 mg af lasalósíðnatríum (3.10) eru vigtuð með 0,1 mg nákvæmni í 100 ml mæliflösku, leyst upp í sýrðu metanóli (3.8) og fyllt upp að kvarðamerkinu með sama leysi og notaður er til blöndunar. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.2. Stöðluð millilausn lasalósíðnatríums (vinnulausn), 50 $\mu\text{g/ml}$

10,0 ml af staðalstofnlausn (3.10.1) eru fluttir með rennipípu í 100 ml mæliflösku, fyllt upp að kvarðamerkinu með sýrðu metanóli (3.8) og blandað. Lausnin skal vera nýlögð við notkun.

3.10.3. Kvörðunarlausnir

Settir eru 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 ml af stöðluðu millilausninni (3.10.2) í röð 50 ml mæliflaskna. Fyllt er upp að kvarðamerkinu með sýrðu metanóli (3.8) og blandað. Þessar lausnir samsvara 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 og 10,0 μg af lasalósíðnatríum í hverjum ml. Lausnirnar skulu vera nýlagðar við notkun.

3.11. Vatn, af hreinleika sem krafist er í hágæðavökvaskiljun.

4. **Búnaður**

- 4.1. Úthljóðsbað (eða hristivatnsbað) með hitastýringu
- 4.2. Himnusíur, 0,45 μm
- 4.3. Búnaður fyrir hágæðavökvaskiljun með innsprautunarkerfi, ætlaður til innsprautunar á 20 μl rúmmáli
- 4.3.1. Vökvaskiljunarsúla 125 mm \times 4 mm, með umbreyttum (vatnsfælnum) fastfasa C18, 5 μm þökkunarefni, eða sambærilegt
- 4.3.2. Flúrskinsnemi með breytilegri stillingu fyrir örvunar- og útgeislunarbylgjulengdir

5. **Framkvæmd**

5.1. Almenn

5.1.1. Eyðusýni

Áður en kemur að framkvæmd endurheimtuprófunarinnar (5.1.2) skal greina eyðusýni til að ganga úr skugga um að hvorki fyrirfinnist lasalósíðnatríum né önnur truflandi efni. Eyðusýnið skal vera svipað að gerð og sýnið sem greina skal og í því skulu hvorki greinast lasalósíðnatríum né truflandi efni.

5.1.2. Endurheimtuprófun

Endurheimtuprófunina skal framkvæma með því að greina eyðusýnið sem hefur verið styrkt með því að bæta við svipuðu magni af lasalósíðnatríum og fyrir er í sýninu. Til að ná styrk sem nemur 100 mg/kg skal setja 10,0 ml af staðalstofnlausninni (3.10.1) í 250 ml keilufloösku og láta lausnina gufa upp þar til hún er um það bil 0,5 ml. 50 g af eyðusýninu er bætt við, blandað vandlega og látið standa í 10 mínútur, blandað nokkrum sinnum í viðbót áður en útdráttur (5.2) er framkvæmdur.

Ef eyðusýni af svipaðri gerð og sýnið er ekki fánlegt (sjá 5.1.1) er hægt að framkvæma endurheimtuprófunina á annan hátt með staðalviðbótum. Í þessu tilviki er sýnið sem á að greina styrkt með svipuðu magni af lasalósíðnatríum og er fyrir í sýninu. Þetta sýni er greint ásamt sýninu sem var ekki styrkt og endurheimtin reiknuð með frádrætti.

5.2. Útdráttur

5.2.1. Fóður

5 til 10 g af sýninu eru vigtuð með 0,01 g nákvæmni í 250 ml keilufloösku með tappa. 100,0 ml af sýrðu metanóli (3.8) er bætt við með rennipípu. Tappanum er stungið lauslega í stútinn og flöskunni hringsnúið svo efnin hristist saman. Flöskunni er komið fyrir í um það bil 40 °C heitu úthljóðsbaði (4.1) og látið standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látið kólna niður í stofuhita. Þessu er leyft að standa í 1 klukkutíma þar til svífefnið hefur sest til, síðan er deiliskammtur síaður gegnum 0,45 μm himnusíu (4.2) í hentugt ílát. Að því loknu er ákvörðun framkvæmd með hágæðavökvaskiljun (5.3).

5.2.2. Forblöndur

Um það bil 2 g af ómalaðri forblöndu eru vigtuð með 0,001 g nákvæmni í 250 ml mælifloösku. 100,0 ml af sýrðu metanóli (3.8) er bætt við og flöskunni hringsnúið svo efnin hristist saman. Flöskunni, ásamt innihaldi, er komið fyrir í um það bil 40 °C heitu úthljóðsbaði (4.1) og látið standa í 20 mínútur, síðan er hún fjarlægð og látið kólna niður í stofuhita. Þynnt er með sýrðu metanóli (3.8) upp að kvarðamerkinu og blandað vandlega saman. Þessu er leyft að standa í einn klukkutíma þar til svífefnið hefur sest til, síðan er deiliskammtur síaður gegnum 0,45 μm himnusíu (4.2). Hæfilegt magn af tæra síuvökvanum er þynnt með sýrðu metanóli (3.8) til að fá endanlega prófunarlausn sem inniheldur um það bil 4 $\mu\text{g/ml}$ af lasalósíðnatríum. Að því loknu er ákvörðun framkvæmd með hágæðavökvaskiljun (5.3).

5.3. Ákvörðun með hágæðavökvaskiljun

5.3.1. Færibreytur

Eftirfarandi skilyrði eru til leiðbeiningar; leyfilegt er að notast við önnur skilyrði, svo framarlega sem þau skila sambærilegum niðurstöðum:

Vökvaskiljunarsúla (4.3.1):	125 mm \times 4 mm, með umbreyttum (vatnsfælnum) fastfasa C18, 5 μm þökkunarefni, eða sambærilegt
Ferðafasi (3.9):	Blanda fosfatjafnalausnarinnar (3.7) og metanóls (3.5), 5 + 95 (V + V)
Rennsli:	1,2 ml/mín.
Ákvörðunarbylgjulengdir:	
— Örvunarbylgjulengd:	310 nm
— Útgeislunarbylgjulengd:	419 nm
Rúmmál innsprautunar:	20 μl

Stöðugleiki vökvaskiljunarkerfisins er athugaður með því að sprauta inn nokkrum sinnum 4,0 µg/ml af kvörðunarlausninni (3.10.3) þar til topphæð (eða flatarmál) og rástímar eru stöðug.

5.3.2. Kvörðunargraf

Hverri kvörðunarlausn (3.10.3) er sprautað inn nokkrum sinnum og meðaltopphæð (-flatarmál) fyrir hvern styrk er ákvörðuð. Teiknað er kvörðunargraf þar sem lóðhnitin eru meðaltopphæð (-flatarmál) og láhnitin eru samsvarandi styrkur gefinn upp í µg/ml.

5.3.3. Sýnislausn

Sýnisútdráttunum, sem fengust í 5.2.1 eða 5.2.2, er sprautað inn nokkrum sinnum þar sem notað er sama rúmmál og var notað fyrir kvörðunarlausnina og síðan er meðaltopphæð (-flatarmál) lasalósídnatriumtoppana ákvörðuð.

6. Útreikningur niðurstaðna

Út frá meðaltopphæð (-flatarmáli) sem fékkst með því að sprauta inn sýnislausninni (5.3.3) skal ákvarða styrk lasalósídnatriúms (µg/ml) með kvörðunargrafið til hliðsjónar.

6.1. Fóður

Lasalósídnatriuminnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

β = styrkur lasalósídnatriúms í sýnislausninni (5.2.1) gefinn upp í µg/ml

V_1 = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt 5.2.1 gefið upp í ml (þ.e. 100)

m = massi prófunarskammtsins gefinn upp í g

6.2. Forblöndur

Lasalósídnatriuminnihaldið w (mg/kg) í sýninu er reiknað með eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

β = styrkur lasalósídnatriúms í sýnislausninni (5.2.2) gefinn upp í µg/ml

V_2 = rúmmál sýnisútdráttarins samkvæmt 5.2.2 gefið upp í ml (þ.e. 250)

f = þynningarstuðull samkvæmt 5.2.2 m = massi prófunarskammtsins gefinn upp í g

7. Sannprófun niðurstaðnanna

7.1. Staðfesting greiniefnis

Greiningaraðferðir sem byggjast á flúrskini eru ekki eins viðkvæmar fyrir truflunum og þær þar sem notast er við útfjólublátt ljós. Hægt er að staðfesta hvert greiniefnið er með samhliða litskiljun (samanburði rástíma).

7.1.1. Samhliða litskiljun

Sýnisútdráttur (5.2.1 eða 5.2.2) er styrktur með því að bæta við hann hæfilegu magni af kvörðunarlausn (3.10.3). Magn þess lasalósídnatriúms, sem bætt er við, ætti að vera svipað magninu sem fyrir er í sýnisútdrættinum. Einungis topphæð lasalósídnatriúms ætti að hækka sem svarar til þess magns lasalósídnatriúms sem var bætt við og sem nemur þynningu útdráttarins. Breidd toppsins í hálfri hæð skal vera innan við $\pm 10\%$ af upprunalegri breidd toppsins sem fenginn var með óstyrkta sýnisútdrættinum.

7.2. Endurtekningarnákvæmni

Mismunur niðurstaðna úr tveimur samhliða ákvörðunum, sem eru gerðar á sama sýninu, skal ekki vera meiri en:

- 15% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósídnatriúms frá 30 mg/kg til 100 mg/kg;
- 15 mg/kg fyrir innihald lasalósídnatriúms frá 100 mg/kg til 200 mg/kg;
- 7,5% af hærra gildinu fyrir innihald lasalósídnatriúms meira en 200 mg/kg.

7.3. Endurheimt

Endurheimtin fyrir styrkta (eyðu)sýnið ætti að minnsta kosti að vera 80%. Endurheimtin fyrir styrktu forblöndusýnin ætti að vera að minnsta kosti 90%.

8. Niðurstöður samanburðarrannsóknar

Samanburðarrannsókn⁽¹⁾ var gerð þar sem tvær forblöndur (sýni 1 og 2) og fimm fôðurefni (sýni 3–7) voru greind á 12 rannsóknarstofum. Hvert sýni var greint tvisvar sinnum. Niðurstöðurnar koma fram í eftirfarandi töflu:

⁽¹⁾ Analyst, 1995, 120, 2175–2180.

	Sýni 1	Sýni 2	Sýni 3	Sýni 4	Sýni 5	Sýni 6	Sýni 7
	Kjúklinga- forblanda	Kalkúna- forblanda	Kalkúna- köggjar	Kjúklinga- kurl	Kalkúna- fóður	Alifugla- fóður A	Alifugla- fóður B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Meðalgildi (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
S_r (mg/kg)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
CV_r (%)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
S_R (mg/kg)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
CV_R (%)							
Nafninnihald (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50 ⁺	35 ⁺

- L = fjöldi rannsóknarstofa
 n = fjöldi einstakra niðurstaðna
 S_r = staðalfrávik endurtekningarnákvæmni
 S_R = staðalfrávik samanburðarnákvæmni
 CV_r = frávíksstuðull endurtekningarnákvæmni, %
 CV_R = frávíksstuðull samanburðarnákvæmni, %
 * innihald gefið upp af framleiðanda
 + fóður sem er undirbúið á rannsóknarstofunni