

KOMMISJONSDIREKTIV 1999/76/EF**2001/EØS/46/16****av 23. juli 1999****om fastsettelse av en analysemetode i Fellesskapet for bestemmelse av lasalocid-natrium i fôrvarer(*)**

KOMMISJONEN FOR DE EUROPEISKE FELLESSKAP HAR —

under henvisning til traktaten om opprettelse av Det europeiske fellesskap,

under henvisning til rådsdirektiv 70/373/EØF av 20. juli 1970 om innføring av prøvetakings- og analysemetoder i Fellesskapet i forbindelse med offentlig kontroll av fôrvarer⁽¹⁾, sist endret ved tiltredelsesakten for Østerrike, Finland og Sverige, særlig artikkel 2, og

ut fra følgende betraktninger:

- 1) I direktiv 70/373/EØF fastsettes det at offentlig kontroll av fôrvarer med sikte på å fastslå at krav fastsatt i henhold til lover og forskrifter om fôvarenes kvalitet og sammensetning er overholdt, skal foretas ved hjelp av Fellesskapets prøvetakings- og analysemetoder.
- 2) I rådsdirektiv 70/524/EØF av 23. november 1970 om tilsetningsstoffer i fôrvarer⁽²⁾, sist endret ved kommisjonsforordning (EF) nr. 866/1999 av 26. april 1999⁽³⁾, fastsettes det at innholdet av lasalocid-natrium skal være angitt i merkingen dersom disse stoffene tilsettes i premikser og fôrvarer.
- 3) Det må fastsettes analysemetoder i Fellesskapet for kontroll av disse stoffene.
- 4) Tiltakene fastsatt i dette direktiv er i samsvar med uttalelse fra Den faste komité for fôrvarer —

VEDTATT DETTE DIREKTIV:

Artikkel 1

Medlemsstatene skal vedta at analysene i forbindelse med offentlig kontroll av innholdet av lasalocid-natrium i fôrvarer og premikser skal utføres ved hjelp av metoden fastsatt i vedlegget til dette direktiv.

Artikkel 2

Medlemsstatene skal innen 31. januar 2000 sette i kraft de lover og forskrifter som er nødvendige for å etterkomme dette direktiv. De skal umiddelbart underrette Kommisjonen om dette.

Medlemsstatene skal anvende disse bestemmelsene fra 1. februar 2000.

Disse bestemmelsene skal, når de vedtas av medlemsstatene, inneholde en henvisning til dette direktiv, eller det skal vises til direktivet når de kunngjøres. Nærmere regler for henvisningen fastsettes av medlemsstatene.

Artikkel 3

Dette direktiv trer i kraft den 20. dag etter at det er kunngjort i *De Europeiske Fellesskaps Tidende*.

Artikkel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstatene.

Utferdiget i Brussel, 23. juli 1999.

For Kommisjonen

Franz FISCHLER

Medlem av Kommisjonen

(*) Denne fellesskapsrettsakten, kunngjort i EFT L 207 av 6.8.1999, s. 13, er omhandlet i EØS-komiteens beslutning nr. 71/2000 av 2. oktober 2000 om endring av EØS-avtalens vedlegg I (Veterinære og plantesanitære forhold), se EØS-tillegget til De Europeiske Fellesskaps Tidende nr. 59 av 14.12.2000, s. 1.

(1) EFT L 170 av 3.8.1970, s. 2.

(2) EFT L 270 av 14.12.1970, s. 1.

(3) EFT L 108 av 27.4.1999, s. 20.

VEDLEGG

BESTEMMELSE AV LASALOCID-NATRIUM

Natriumsalt av en monokarboksylyrepolyeter som dannes av *Streptomyces lasaliensis*

1. Formål og bruksområde

Denne metoden gjør det mulig å bestemme lasalocid-natrium i fôrvarer og premikser. Påvisningsgrensen er 5 mg/kg, bestemmelsesgrensen er 30 mg/kg.

2. Prinsipp

Lasalocid-natrium ekstraheres fra prøven i sur metanol og bestemmes ved reversfase høytrykksvæskeskromatografi (HPLC) ved bruk av en spektrofluorimetrisk detektor.

3. Reagenser

3.1. Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4)

3.2. Ortofosforsyre, w = 85 %

3.3. Ortofosforsyreløsning, $\sigma = 20$ %

23,5 ml ortofosforsyre (3.2) fortynnes med vann til 100 ml.

3.4. 6-metyl-2-heptylamin (1,5-dimetylheksylamin), w = 99 %

3.5. Metanol, HPLC-kvalitet

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

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

1,36 g KH_2PO_4 (3.1) oppløses i 500 ml vann (3.11), og det tilsettes 3,5 ml ortofosforsyre (3.2) og 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamin (3.4). pH-verdien justeres til 4,0 med ortofosforsyreløsning (3.3), og det fortynnes til 1 000 ml med vann (3.11).

3.8. Sur metanol

5,0 ml saltsyre (3.6) overføres til en målekolbe på 1 000 ml, det fylles opp til merket med metanol (3.5) og blandes. Denne løsningen må tilberedes umiddelbart før bruk.

3.9. HPLC mobil fase, fosfatbuffer-metanolløsning (5 + 95) (V + V)

5 ml av fosfatbufferløsningen (3.7) blandes med 95 ml metanol (3.5).

3.10. Lasalocid-natrium-standardstoff med garantert renhet, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natriumsalt av en monokarboksylyrepolyeter som dannes av *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Lasalocid-natrium-standardstamløsning, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

50 mg lasalocid-natrium (3.10) veies opp med en nøyaktighet på 0,1 mg i en målekolbe på 100 ml, det oppløses i sur metanol (3.8), fylles opp til merket med samme løsemiddel og blandes. Denne løsningen må tilberedes umiddelbart før bruk.

3.10.2. Lasalocid-natrium-standardmellomløsning, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) pipetteres over i en målekolbe på 100 ml, det fylles opp til merket med sur metanol (3.8) og blandes. Denne løsningen må tilberedes umiddelbart før bruk.

3.10.3. Kalibreringsløsninger

Til en rekke målekolber på 50 ml overføres 1,0, 2,0, 4,0 5,0 og 10,0 ml av standardmellomløsningen (3.10.2). Det fylles opp til merket med sur metanol (3.8) og blandes. Disse løsningene svarer til henholdsvis 1,0, 2,0, 4,0 5,0 og 10,0 μg lasalocid-natrium per ml. Disse løsningene må tilberedes umiddelbart før bruk.

3.11. Vann, HPLC-kvalitet.

4. Apparatur

- 4.1. Ultralydbad (eller vannbad med risteinnretning) med termostat
- 4.2. Membranfiltere, 0,45 µm
- 4.3. HPLC-utstyr med injeksjonssystem, egnet til injeksjonsmengder på 20 µl
- 4.3.1. Væskekromatografikolonne, 125 mm x 4 mm, reversfase C18, 5 µm pakning eller tilsvarende
- 4.3.2. Spektrofluorimeter med variabel innstilling av eksitasjons- og emisjonsbølgelengden

5. Framgangsmåte

5.1. Generelt

5.1.1. Blindprøve

For gjennomføring av gjenfinningsprøven (5.1.2) bør en blindprøve analyseres for å kontrollere at det verken er lasalocid-natrium eller forstyrrende stoffer til stede. Blindprøven bør være av tilsvarende type som selve prøven, og lasalocid-natrium eller forstyrrende stoffer må ikke påvises.

5.1.2. Gjenfinningsprøve

En gjenfinningsprøve bør utføres ved å analysere blindprøven etter at den er tilsatt samme mengde lasalocid-natrium som i selve prøven. For å øke konsentrasjonen til 100 mg/kg overføres 10 ml av standardstamløsningen (3.10.1) til en erlenmeyerkolbe på 250 ml, og løsningen inndampes til ca. 0,5 ml. Deretter tilsettes 50 g av blindprøven, det blandes grundig, og prøven får stå i 10 min og blandes flere ganger før ekstraksjonen (5.2) påbegynnes.

Dersom det ikke finnes en blindprøve av tilsvarende type som selve prøven (se 5.1.1), kan det alternativt utføres en gjenfinningsprøve ved hjelp av standardtilsetningsmetoden. I slike tilfeller tilsettes prøven som skal analyseres, en mengde lasalocid-natrium som tilsvarer mengden som allerede er til stede i prøven. Denne prøven analyseres sammen med prøven uten økt konsentrasjon, og gjenfinningen kan beregnes ved subtraksjon.

5.2. Ekstraksjon

5.2.1. Fôrvarer

5-10 g av prøven veies opp med en nøyaktighet på 0,01 g og overføres til en 250 ml erlenmeyerkolbe med propp. 100,0 ml sur metanol (3.8) tilsettes med pipette. Proppen settes løst i, og kolben ristes forsiktig slik at prøven spres. Kolben settes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, deretter fjernes den fra ultralydbadet og avkjøles til romtemperatur. La kolben stå i ca. 1 time til prøven har bunnfelt seg, deretter filtreres en delmengde gjennom et membranfilter på 0,45 µm (4.2) ned i en egnet beholder. Det fortsettes med HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.2.2. Premikser

Ca. 2 g av den umalte prøven veies opp med en nøyaktighet på 0,001 g og overføres til en målekolbe på 250 ml. 100,0 ml sur metanol (3.8) tilsettes, og kolben ristes forsiktig slik at prøven spres. Kolben settes i ultralydbad (4.1) ved ca. 40 °C i 20 minutter, deretter fjernes den fra ultralydbadet og avkjøles til romtemperatur. Prøven fortynnes opp til merket med sur metanol (3.8), og det blandes grundig. La kolben stå i ca. 1 time til prøven har bunnfelt seg, deretter filtreres en delmengde gjennom et membranfilter på 0,45 µm (4.2). En passende mengde av det klare filtratet fortynnes med sur metanol (3.8), slik at resultatet blir en endelig prøveløsning som inneholder ca. 4 µg/ml lasalocid-natrium. Det fortsettes med HPLC-bestemmelsen (5.3).

5.3. HPLC-bestemmelse

5.3.1. Parametere

Følgende vilkår er veiledende, andre vilkår kan brukes forutsatt at de gir samme resultater.

Væskekromatografikolonne (4.3.1): 125 mm x 4 mm, reversfase C18, 5 µm pakning eller tilsvarende

Mobil fase (3.9): Blanding av fosfatbufferløsning (3.7) og metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)

Gjennomstrømningshastighet: 1,2 ml/min

Detektorbølglengder:

— Eksitasjon: 310 nm

— Emisjon: 419 nm

Injeksjonsmengde: 20 µl

Kromatografisystemets stabilitet kontrolleres ved å injisere kalibreringsløsningen (3.10.3) som inneholder 4,0 µg/ml, flere ganger, til det oppnås konstante topphøyder (eller arealer) og retensjonstider.

5.3.2. Kalibreringskurve

Hver kalibreringsløsning (3.10.3) injiseres flere ganger, og gjennomsnittet av topphøydene (arealer) for hver konsentrasjon bestemmes. Det konstrueres en kalibreringskurve ved å benytte gjennomsnittet av topphøydene (-arealene) av kalibreringsløsningene som ordinater og de tilsvarende konsentrasjonene i µg/ml som abscisser.

5.3.3. Prøveløsning

Prøveekstraktene fra 5.2.1 eller 5.2.2 injiseres flere ganger, og det brukes samme volum som for kalibreringsløsningene når gjennomsnittet av topphøyden (-arealet) av lasalocid-natrium-toppene bestemmes.

6. Beregning av resultater

Konsentrasjonen av lasalocid-natrium i µg/ml bestemmes ut fra den gjennomsnittlige topphøyden (-arealet) som er oppnådd ved injeksjon av prøveløsningen (5.3.3) med henvisning til kalibreringskurven.

6.1. Fôrvarer

Innholdet av lasalocid-natrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

β = konsentrasjonen av lasalocid-natrium i prøveløsningen (5.2.1) i µg/ml,

V_1 = mengden av prøveekstraktet ifølge 5.2.1 i ml (dvs. 100),

m = prøvemengdens masse i g.

6.2. Premikser

Innholdet av lasalocid-natrium w (mg/kg) i prøven beregnes etter følgende formel:

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

der:

β = konsentrasjonen av lasalocid-natrium i prøveløsningen (5.2.2) i µg/ml

V_2 = mengden av prøveekstraktet ifølge 5.2.2 i ml (dvs. 250)

f = fortynningsfaktor ifølge 5.2.2

m = prøvemengdens masse i g

7. Validering av resultatene

7.1 Identitet

Metoder basert på spektrofluorimetri er mindre utsatt for interferens enn metoder der det brukes en UV-detektor. Identiteten til analytten kan bekreftes ved kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff.

7.1.1. Kromatografi med tilsetning av kjent mengde standardstoff

Konsentrasjonen i et prøveekstrakt (5.2.1 eller 5.2.2) økes ved tilsetting av en passende mengde kalibreringsløsning (3.10.3). Mengden av lasalocid-natrium som tilsettes, bør være lik mengden av lasalocid-natrium som er funnet i prøveekstraktet. Det er bare høyden av lasalocid-natrium-toppen som bør økes, etter at det er tatt hensyn både til mengden som er tilsatt, og til fortynningen av ekstraktet. Bredden av toppen, i halv høyde, skal være innenfor $\pm 10\%$ av den opprinnelige bredden av lasalocid-natrium-toppen av prøveekstraktet uten økt konsentrasjon.

7.2. Repeterbarhet

Forskjellen mellom resultatene av to parallelle bestemmelser som utføres på samme prøve, må ikke overstige

- 15 % av det høyeste resultatet for et innhold av lasalocid-natrium på mellom 30 og 100 mg/kg,
- 15 mg/kg for et innhold av lasalocid-natrium på mellom 100 og 200 mg/kg,
- 7,5 % av det høyeste resultatet for et innhold av lasalocid-natrium på over 200 mg/kg.

7.3. Gjenfinning

Gjenfinningen for en blindprøve av fôrvarer tilsatt standard skal være minst 80 %. Gjenfinningen for en blindprøve av premikser tilsatt standard skal være minst 90 %.

8. Resultater av en fellesanalyse

Det har vært organisert en fellesanalyse⁽¹⁾ der to prøver av premikser (prøve 1 og 2) og 5 prøver av fôrvarer (prøve 3-7) ble analysert av 12 laboratorier. Resultatene er oppført i tabellen nedenfor:

	Prøve 1 Kylling- premikser	Prøve 2 Kalkun- premikser	Prøve 3 Kalkun- pelleter	Prøve 4 Kylling- granulat	Prøve 5 Kalkun- fôr	Prøve 6 Fjørfe- fôr A	Prøve 7 Fjørfe- fôr B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Gjennomsnitt (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
Nominelt innhold (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50+	35+

L = antall laboratorier

n = antall enkeltverdier

S_r = standardavvik for repeterbarhet

S_R = standardavvik for reproducerbarhet

CV_r = variasjonskoeffisient for repeterbarhet, %

CV_R = variasjonskoeffisient for reproducerbarhet, %

* innhold opplyst av produsenten

+ fôr framstilt i laboratoriet

⁽¹⁾ Analyst, 1995, 120, 2175 - 2180.