

ДИРЕКТИВА 1999/76/ЕО НА КОМИСИЯТА

от 23 юли 1999 година

относно установяването на методи на Общността за анализ за дозиране на натриев лазалоцид в храните за животни

(Текст от значение за ЕИП)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 70/373/ЕИО на Съвета от 20 юли 1970 г. относно въвеждането на методи на Общността за вземани на проби и анализ за целите на официалния контрол на храните за животни ¹, последно изменена с Акта за присъединяване на Австрия, Финландия и Швеция, и по-специално член 2 от нея,

(1) като има предвид, че Директива 70/373/ЕИО предвижда, че официалният контрол на храните за животни за проверка спазването на изискванията, които следват от законовите, подзаконовите и административни разпоредби, регулиращи качеството и състава им, трябва да се извършва, като се използват методи на Общността за вземане на проби и анализ;

(2) като има предвид, че Директива 70/524/ЕИО на Съвета от 23 ноември 1970 г. относно добавките във храните за животни ², последно изменена с Регламент (ЕО) № 866/1999 на Комисията от 26 април 1999 г. ³, предвижда, че съдържанието на натриев лазалоцид трябва да бъде посочено на етикетите, когато тези субстанции са добавени към премиксите и храните за животни;

(3) като има предвид, че трябва да се дефинират методи на Общността откриване наличието на тези субстанции;

(4) като има предвид, че мерките предвидени в настоящата директива са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните за животни,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки постановяват провеждането на анализите с оглед на официалния контрол на съдържанието на лазалоцид във храните за животни и премиксите да се извършва, като се използва метода, изложен в приложението тук.

Член 2

Държавите-членки въвеждат необходимите закони, подзаконови и административни разпоредби, за да приведат своето законодателство в

¹ ОВ L 170, 3.8.1970 г., стр. 2.

² ОВ L 270, 14.12.1970 г., стр. 1.

³ ОВ L 108, 27.4.1999 г., стр. 20.

съответствие с настоящата директива, не по-късно от 31 януари 2000 г. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

Те прилагат мерките от 1 февруари 2000 г.

Когато държавите-членки приемат тези разпоредби, в тях се съдържа цитиране на настоящата директива или то се извършва при официалното им публикуване. Процедурата на такова цитиране се приемат от държавите-членки.

Член 3

Настоящата директива влиза в сила на двадесетия ден след публикуването ѝ в *Официален вестник на Европейските общности*.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел, на 23 юли 1999 година.

За Комисията:
Franz FISCHLER
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НАТРИЕВ ЛАЗАЛОЦИД

Натриева сол на полиетерната монокарбоксилна киселина, получена от *Streptomyces lasaliensis*

1. Цел и обхват

С този метод се определя съдържанието на натриев лазалоцид във храните за животни и премиксите. Границата на откриване е 5 mg/kg, а границата на определяне е 30 mg/kg.

2. Принцип

Натриев лазалоцид се извлича от проба в подкислен метанол и се определя чрез високо-ефективна течна хроматография (HPLC) с обратна фаза, с помощта на спектрофлуориметричен детектор.

3. Реактиви

3.1. Калиев дихидрогенфосфат (KH_2PO_4)

3.2. Ортофосфорна киселина, w = 85 %

3.3. Разтвор на ортофосфорна киселина, $\sigma = 20 \%$

Разредете 23,5 ml ортофосфорна киселина (3.2) до 100 ml с вода.

3.4. 6-Метил-2-хептиламин (1,5-диметилхексиламин), w = 99 %

3.5. Метанол, клас HPLC

3.6. Солна киселина, $\rho_{20} 1,19 \text{ g/ml}$

3.7. Буферен разтвор на фосфат, c = 0,01 мол/л

Разтворете 1,36 г от KH_2PO_4 (3.1) в 500 ml вода (3.11), добавете 3,5 ml ортофосфорна киселина (3.2) и 10,0 ml 6-метил-2-хептиламин (3.4). Прибавете разтвор на ортофосфорна киселина (3.3) до получаване на pH 4,0 и разредете до 1 000 ml с вода (3.11).

3.8. Подкислен метанол

Прехвърлете 5,0 ml солна киселина (3.6) в 1 000 милилитрова мерителна колба, допълнете с метанол (3.5) до маркировката, и разбъркайте. Разтворът трябва да бъде прясно приготвен преди употреба.

3.9. HPLC мобилна фаза, фосфато буферен метанолен разтвор 5 + 95 (V + V)

Смесете 5 ml от фосфатния буферен разтвор (3.7) с 95 ml метанол (3.5).

3.10. Стандартна субстанция на натриев лазалоцид с гарантирана чистота, $C_{14}H_{53}O_8Na$ (натриева сол на полиетерната монокарбоксилна киселина, получена от *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Основен стандартен разтвор на натриев лазалоцид, 500 µg/ml

Претеглете с точност до 0,1 mg и поставете 50 mg натриев лазалоцид (3.10) в мерителна колба от 100 ml, разтворете в подкислен метанол (3.8), допълнете със същия разтворител до маркировката, и разбъркайте. Разтворът трябва да бъде прясно приготвен преди употреба.

3.10.2. Междинен стандартен разтвор на натриев лазалоцид, 50 µg/ml

Отмерете с пипета 10,0 ml от основния стандартен разтвор (3.10.1) в мерителна колба от 100 ml, допълнете с подкислен метанол (3.8) до маркировката, и разбъркайте. Разтворът трябва да бъде прясно приготвен преди употреба.

3.10.3. Калибрационни разтвори

Прехвърлете съответно 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 и 10.0 ml от междинния стандартен разтвор (3.10.2) в серия от 50-милилитрови градуирани колби. Допълнете с подкислен метанол (3.8) до маркировката, и разбъркайте. Тези разтвори отговарят съответно на 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 и 10.0 µg натриев лазалоцид на ml. Разтворите трябва да бъдат прясно приготвени преди употреба.

3.11. Вода, клас HPLC

4. Апаратура

4.1. Ултразвукова вана (или вибрираща водна баня) с регулиране на температурата

4.2. Мембранни филтри, 0,45 µm

4.3. Оборудване за HPLC с инжекционна система, подходяща за инжектиране на обеми от 20 µl .

4.3.1. Колона за течен хроматографски анализ 125 mm x 4 mm, обратна фаза C18, опаковка 5 µm или еквивалент

4.3.2. Спектрофлуориметър с регулиране за промяна на дължините на вълните при възбуждане и емисия

5. Процедура

5.1. Общо описание

5.1.1. Празна проба храна за животни

За изпълнението на теста за извличане (5.1.2), следва да се анализира проба храна за животни за да се провери за наличие на натриев лазалоцид и пречещи

субстанции. Храната за животни от пробата трябва да е подобен по вид на този от изследваната проба и в него не трябва да се открива наличие на натриев лазалоцид или пречещи субстанции.

5.1.2. Тест за извличане

Тестът за извличане се извършва, като се анализира пробата храна за животни, обогатена чрез прибавяне на такова количество натриев лазалоцид, близко до наличното в пробата. За да обогатите при ниво 100 mg/kg, пресипете 10.0 ml от основния стандартен разтвор (3.10.1) в конична колба от 250 ml и изпарете разтвора, докато получите приблизително 0,5 ml. Добавете 50 g проба храна за животни, смесете добре и оставете да престои 10 минути. Разбъркайте отново няколко пъти, преди да преминете към екстракцията (5.2).

Като алтернатива, ако не разполагате с храна за животни за проба, подобен по вид на този от изследваната проба (виж 5.1.1), тестът за извличане може да се извърши чрез стандартен метод на добавяне. В този случай пробата, която ще се анализира, се обогатява с такова количество натриев лазалоцид, което е близко до наличното в пробата. Тази проба се анализира заедно с необогатената проба, като извличането се калкулира чрез изваждане.

5.2. Екстракция

5.2.1. Храни за животни

Претеглете с точност до 0,01 g и поставете от 5 g до 10 g от пробата в 250-милилитрова конична колба с тапа. Прибавете с пипета 100,0 ml подкислен метанол (3.8). Запушете леко с тапата и разклатете за да може съдържанието да се диспергира. Поставете колбата в ултразвукова вана (4.1) при температура приблизително 40° C за 20 минути, след което я отместете и охладете до стайна температура. Оставете да престои около 1 час, докато суспензията се утаи, след което филтрирайте в подходящ съд една аликвотна част през мембранен филтър 0,45 µm (4.2). Пристъпете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.2.2. Премикси

Претеглете с точност до 0,001 g и поставете около 2 g несмлян премикс в мерителна колба от 250 ml. Прибавете 100,0 ml подкислен метанол (3.8) и разклатете за да може съдържанието да се диспергира. Поставете колбата със съдържанието в нея в ултразвукова вана (4.1) при температура приблизително 40° C за 20 минути, след което отместете и охладете до стайна температура. Разредете с подкислен метанол (3.8) до маркировката и смесете добре. Оставете да престои около 1 час, докато суспензията се утаи, след което филтрирайте една аликвотна част през мембранен филтър 0,45 µm (4.2). Разредете подходящ обем от чистия филтрат с подкислен метанол (3.8) за да получите окончателен разтвор за тестване, който съдържа около 4 µg/ml натриев лазалоцид. Пристъпете към определяне чрез HPLC (5.3).

5.3. Определяне чрез HPLC

5.3.1. Параметри

Следните условия се посочват като указващи; може да се използват други, при условие, че дават равностойни резултати:

Колона за течен хроматографски анализ (4.3.1): 125 mm x 4 mm, обратна фаза C18, опаковка 5 µm или еквивалент

Мобилна фаза (3.9): разтвор (3.7) и метанол (3.5), 5 + 95 (V + V)	Смес на фосфатен буферен
---	--------------------------

Скорост на пропускане:	1,2 ml/min.
------------------------	-------------

Дължина на детекция:

- Възбуждане:	310 nm
- Емисия:	419 nm

Инжекционен обем:	20 µl
-------------------	-------

Проверете стабилността на хроматографската система, като инжектирате няколко пъти калибрационен разтвор (3.10.3), съдържащ 4,0 µg/ml, докато бъдат постигнати постоянни пикови височини (или площи) и времена на задържане.

5.3.2. Калибрираща графика

Инжектирайте от всеки калибрационен разтвор (3.10.3) по няколко пъти и определете средните пикови височини (площи) за всяка концентрация. Начертайте калибрираща графика, като използвате средните пикови височини (площи) за ординати, а съответстващите концентрации - за абсциси

5.3.3. Разтвор на пробата

Инжектирайте няколко пъти получените в 5.2.1.или 5.2.2 екстракти от изследваната проба, като използвате същият обем, взет при калибрационния разтвор, и определете средните пикови височини (площи) на пиковите на натриевия лазалоксид.

6. Изчисление на резултатите

От средната пикова височина (площ), получена чрез инжектиране на разтвора на пробата (5.3.3), определете концентрацията на натриев лазалоксид (µg/ml) по калибриращата графика.

6.1.храни за животни

Съдържанието на натриев лазалоксид, w (mg/kg) в пробата се изразява със следната формула:

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{\text{-----}} [\text{mg/kg}] \quad \text{където:}$$

m

β = концентрация на натриев лазалоцид в разтвора на пробата (5.2.1) в $\mu\text{g/ml}$

V_1 = обем на екстракта от пробата, съгласно 5.2.1 в ml (т.е. 100)

m = масата в g на взетата за анализ част

6.2. Премикси

Съдържанието на натриев лазалоцид w (mg/kg) в пробата се изразява със следната формула:

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

β = концентрацията на натриев лазалоцид в разтвора на пробата (5.2.2) в $\mu\text{g/ml}$

V_2 = обем на екстракта от пробата, съгласно 5.2.2 в ml (т.е. 250)

f = фактор на разреждане, съгласно 5.2.2

m = масата в g на взетата за анализ част

7. Потвърждаване на резултатите

7.1. Идентичност

Методите, които са базирани на спектрофлуориметрията, са в по-малка степен подложени на смущения, отколкото тези, при които се използва UV детекция. Идентичността на анализа може да се потвърди чрез ко-хроматография.

7.1.1. Ко-хроматография

Обогатява се екстракт от пробата (5.2.1 или 5.2.2), като се добави подходящо количество калибрационен разтвор (3.10.3). Количеството добавен натриев лазалоцид трябва да бъде близко до това, открито в екстракта от пробата. На базата на добавеното количество натриев лазалоцид и разреждането на екстракта, следва да се увеличи само височината на пика на натриевия лазалоцид. Широчината на пика, при половин височина, трябва да бъде в границите на $\pm 10 \%$ от оригиналната широчина на пика, получен при необогатения екстракт от пробата.

7.2. Повторяемост

Разликата между резултатите от две паралелни определяния, проведени върху същата проба, не трябва да превишава:

- 15 % спрямо по-високата стойност при съдържание на натриев лазалоцид от 30 mg/kg до 100 mg/kg;
- 15 mg/kg при съдържание на натриев лазалоцид от 100 mg/kg до 200 mg/kg;
- 7,5 % спрямо по-високата стойност при съдържание на натриев лазалоцид над 200 mg/kg.

7.3. Извличане

При обогатената проба храна за животни, извличането трябва да бъде най-малко 80 %. При обогатените проби премикси, извличането трябва да бъде най-малко 90 %.

8. Резултати от паралелно изследване

Проведено беше паралелно изследване ⁴, при което бяха анализирани 2 премикса (проби 1 и 2) и 5 храна за животни (проби 3-7) от 12 лаборатории. Върху всяка проба беше извършен двоен анализ. Резултатите са представени в следната таблица:

	Проба 1 Пилета Премикс	Проба 2 Пуйки Премикс	Проба 3 Пуйки Гранулиран	Проба 4 Пилета Натрошен	Проба 5 Пуйки храна за животни	Проба 6 Домашни птици храна за животни А	Проба 7 Домашни птици храна за животни В
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Средно (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
Номинално съдържание (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50 ⁺	35 ⁺
L = брой лаборатории N = брой на отделните резултати S_r = стандартно отклонение на повторемостта S_R = стандартно отклонение на възпроизводимостта CV_r = коефициент на изменение на повторемостта, % CV_R = коефициент на изменение на възпроизводимостта, % * съдържание, декларирано от производителя ⁺ храна, приготвена в лабораторията							

⁴ Аналитик, 1995, 120, 2175-2180.