

**DIRECTIVA 1999/76/CE DE LA COMISIÓN****de 23 de julio de 1999****por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de lasalocid sódico en los alimentos para animales****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 70/373/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1970, relativa a la introducción de métodos para la toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal <sup>(1)</sup>, cuya última modificación la constituye el Acta de adhesión de Austria, de Finlandia y de Suecia, y, en particular, su artículo 2,

- (1) Considerando que la Directiva 70/373/CEE establece que los controles oficiales de los alimentos para animales, dirigidos a comprobar la observancia de las condiciones establecidas en virtud de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas referentes a la calidad y a la composición de dichos alimentos, deben efectuarse según métodos de toma de muestras y de análisis comunitarios;
- (2) Considerando que la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal <sup>(2)</sup>, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 866/1999 de la Comisión <sup>(3)</sup>, dispone que el contenido de lasalocid sódico debe señalarse en el etiquetado cuando dicha sustancia se añada a las premezclas y alimentos para animales;
- (3) Considerando que es necesario fijar métodos de análisis comunitarios para el control de esta sustancia;
- (4) Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

*Artículo 1*

Los Estados miembros dispondrán que los análisis realizados en relación con los controles oficiales del contenido en lasalocid

de los alimentos para animales y premezclas se efectúen siguiendo los métodos que se describen en el anexo.

*Artículo 2*

A más tardar el 31 de enero de 2000, los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a lo dispuesto en la presente Directiva. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Aplicarán dichas medidas a partir del 1 de febrero de 2000.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

*Artículo 3*

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

*Artículo 4*

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 23 de julio de 1999.

*Por la Comisión*

Franz FISCHLER

*Miembro de la Comisión*

<sup>(1)</sup> DO L 170 de 3.8.1970, p. 2.

<sup>(2)</sup> DO L 270 de 14.12.1970, p. 1.

<sup>(3)</sup> DO L 108 de 27.4.1999, p. 20.

## ANEXO

**DETERMINACIÓN DE LASALOCID SÓDICO**

Sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*

**1. Objeto y ámbito de aplicación**

El presente método permite la determinación de lasalocid sódico en los alimentos para animales y premezclas. El límite de detección es de 5 mg/kg; el de determinación, de 30 mg/kg.

**2. Principio**

El lasalocid sódico se extrae de la muestra con metanol acidulado y su contenido se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase inversa con detección espectrofluorimétrica.

**3. Reactivos**

3.1. Fosfato de dihidrógeno y potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

3.2. Ácido ortofosfórico, w = 85 %

3.3. Solución de ácido ortofosfórico, c = 20 %

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) con agua hasta llegar a 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilamina (1,5-dimetilhexilamina), w = 99 %

3.5. Metanol de calidad CLAR.

3.6. Ácido clorhídrico,  $\pi_{20}$  1,19 g/ml

3.7. Solución amortiguadora de fosfato, c = 0,01 mol/l

Disolver 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.1) en 500 ml de agua (3.11), añadir 3,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) y 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamina (3.4). Ajustar el pH a 4,0 con solución de ácido ortofosfórico (3.3) y diluir con agua (3.11) hasta 1 000 ml.

3.8. Metanol acidulado

Pasar 5,0 ml de ácido clorhídrico (3.6) a un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con metanol (3.5) y mezclar. Esta solución debe prepararse justo antes de su utilización.

3.9. Fase móvil para la CLAR: solución amortiguadora de fosfato + metanol, 5 + 95 (V + V)

Mezclar 5 ml de solución amortiguadora de fosfato (3.7) con 95 ml de metanol (3.5).

3.10. Sustancia patrón: lasalocid sódico de pureza garantizada,  $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$  (sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Solución madre de patrón de lasalocid sódico, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pesar, con precisión de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sódico (3.10) en un matraz aforado de 100 ml, disolver y enrasar con metanol acidulado (3.8) y mezclar. Esta solución debe prepararse justo antes de su utilización.

3.10.2. Solución intermedia de patrón de lasalocid sódico, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pasar con pipeta 10,0 ml de la solución madre de patrón (3.10.1) a un matraz aforado de 100 ml, enrasar con metanol acidulado (3.8) y mezclar. Esta solución debe prepararse justo antes de su utilización.

3.10.3. Soluciones de calibración

Pasar 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución intermedia de patrón (3.10.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con metanol acidulado (3.8) y mezclar. Estas soluciones corresponden a 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0  $\mu\text{g}$  de lasalocid sódico por ml, respectivamente, y deben prepararse justo antes de su utilización.

3.11. Agua de calidad CLAR.

#### 4. Equipo

- 4.1. Baño de ultrasonidos (o baño de agua con agitación), de temperatura controlada
- 4.2. Filtros de membrana, 0,45 µm
- 4.3. Equipo para CLAR con sistema de inyección que permita unos volúmenes de inyección de 20 µm
- 4.3.1. Columna de cromatografía de líquidos de 125 mm x 4 mm, de fase inversa C18, con empaquetamiento de 5 µm o equivalente
- 4.3.2. Espectrofluorímetro con ajuste variable de las longitudes de onda de excitación y de emisión

#### 5. Procedimiento

##### 5.1. Consideraciones generales

###### 5.1.1. Prueba en blanco

Para la prueba de recuperación (5.1.2) debe analizarse un pienso en blanco a fin de comprobar la ausencia de lasalocid sódico y de sustancias de interferencia. El pienso en blanco debe ser de tipo similar a la muestra y en él no debe detectarse lasalocid sódico ni sustancias de interferencia.

###### 5.1.2. Prueba de recuperación

Debe realizarse una prueba de recuperación analizando el pienso en blanco que se habrá enriquecido por adición de una cantidad de lasalocid sódico similar a la presente en la muestra. Para añadir una concentración de 100 mg/kg, poner 10,0 ml de la solución madre de patrón (3.10.1) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución hasta que queden unos 0,5 ml; añadir 50 g del pienso en blanco y mezclar cuidadosamente; dejar en reposo durante 10 minutos, volviendo a mezclar varias veces, y pasar a la fase de extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), otra posibilidad consiste en realizar una prueba de recuperación mediante el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de lasalocid sódico similar a la que ya esté presente en la misma. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

##### 5.2. Extracción

###### 5.2.1. Alimentos para animales

Pesar, con precisión de 0,01 g, entre 5 y 10 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón. Añadir con pipeta 100,0 ml de metanol acidulado (3.8). Tapar sin apretar el tapón y agitar para dispersar. Poner el matraz en un baño de ultrasonidos (4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos; sacarlo después y enfriar a temperatura ambiente. Dejar en reposo durante 1 hora hasta que sedimente la materia en suspensión; pasar después una parte alícuota a través de un filtro de membrana de 0,45 µm (4.2) a un recipiente apropiado. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

###### 5.2.2. Premezclas

Pesar, con precisión de 0,001 g, unos 2 g de la premezcla sin triturar en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 100,0 ml de metanol acidulado (3.8) y agitar para dispersar. Poner el matraz y su contenido en un baño de ultrasonidos (4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos, sacarlo después y enfriar a temperatura ambiente. Enrasar con metanol acidulado (3.8) y mezclar cuidadosamente. Dejar en reposo durante 1 hora hasta que sedimente la materia en suspensión; filtrar después una parte alícuota a través de un filtro de membrana de 0,45 µm (4.2). Diluir un volumen adecuado del filtrado claro con metanol acidulado (3.8) para obtener una solución final de prueba que contenga unos 4 µg/ml de lasalocid sódico. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

##### 5.3. Determinación mediante CLAR

###### 5.3.1. Parámetros

Las siguientes condiciones se proponen con carácter indicativo, por lo que podrán aplicarse otras si ofrecen resultados equivalentes:

Columna de cromatografía de líquidos (4.3.1):	125 mm × 4 mm, fase inversa C18, empaquetamiento 5 µm o equivalente
Fase móvil (3.9):	Mezcla de solución amortiguadora de fosfato (3.7) (3.7) y metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Flujo:	1,2 ml/min
Longitudes de onda de detección:	
— Excitación	310 mm
— Emisión	419 mm
Volumen de inyección	20 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.10.3) con 4,0 µg/ml, hasta obtener alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

#### 5.3.2. Curva de calibración

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.10.3) y determinar las alturas (áreas) medias de los picos correspondientes a cada concentración. Trazar una curva de calibración poniendo las alturas (áreas) medias de los picos en ordenadas y las concentraciones correspondientes en µg/ml en abscisas.

#### 5.3.3. Solución de muestra

Inyectar varias veces el extracto de la muestra obtenido en 5.2.1 o 5.2.2 utilizando el mismo volumen que el empleado para las soluciones de calibración y determinar la altura (área) media de los picos de lasalocid sódico.

### 6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos obtenidos por inyección de la solución de la muestra (5.3.3), determinar la concentración de lasalocid sódico en µg/ml mediante la curva de calibración.

#### 6.1. Alimentos para animales

El contenido w de lasalocid sódico de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

β = concentración de lasalocid sódico en la solución de la muestra (5.2.1) en µg/ml

V = volumen del extracto de la muestra según 5.2.1 en ml (es decir, 100)

m = masa de la porción de muestra en g.

#### 6.2. Premezclas

El contenido w de lasalocid sódico de la muestra, expresado en mg/kg, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

β = concentración de lasalocid sódico en la solución de la muestra (5.2.2) en µg/ml

V = volumen del extracto de la muestra según 5.2.2 en ml (es decir, 250)

f = factor de dilución de acuerdo con 5.2.2

m = masa de la porción de muestra en g.

### 7. Validación de los resultados

#### 7.1. Identidad

Los métodos basados en espectrofluorimetría están menos expuestos a sufrir interferencias que los que utilizan detección por UV. La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía.

##### 7.1.1. Cocromatografía

Se enriquece un extracto de la muestra (5.2.1 o 5.2.2) mediante adición de una cantidad adecuada de una solución de calibración (3.10.3). La cantidad de lasalocid sódico añadido debe ser similar a la cantidad de lasalocid sódico que se encuentre en el extracto de la muestra. Solamente debe aumentar la altura del pico de lasalocid sódico, en una proporción basada en la cantidad añadida y en la dilución del extracto. La anchura del pico a la mitad de su altura debe estar dentro del margen del ± 10 % de la anchura inicial del pico de lasalocid sódico del extracto de la muestra antes de ser enriquecido.

#### 7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe superar:

— el 15 % del resultado superior en caso de contenido de lasalocid sódico entre 30 y 100 mg/kg,

— 15 mg/kg en caso de contenido de lasalocid sódico entre 100 y 200 mg/kg,

— el 7,5 % del resultado superior en caso de contenido de lasalocid sódico mayor de 200 mg/kg.

#### 7.3. Recuperación

En el caso de una muestra de pienso (en blanco) enriquecida, la recuperación debe ser como mínimo del 80 %. En el caso de una muestra de premezcla enriquecida, la recuperación debe ser como mínimo del 90 %.

### 8. Resultados de un estudio en colaboración

Se organizó un estudio en colaboración <sup>(1)</sup> en el que 12 laboratorios analizaron dos premezclas (muestras 1 y 2) y cinco piensos (muestras 3 a 7). De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Los resultados se recogen en el siguiente cuadro:

<sup>(1)</sup> Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

	Muestra 1 Premezcla de polio	Muestra 2 Premezcla de pavo	Muestra 3 Gránulas de pavo	Muestra 4 Gránulas de pollo	Muestra 5 Pienso de pavo	Muestra 6 Pienso de aves de corral A	Muestra 7 Pienso de aves de corral B
L	12	12	12	12	12	12	12
N	23	23	23	23	23	23	23
Media (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
S <sub>r</sub> [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV <sub>r</sub> [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
S <sub>R</sub> [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV <sub>R</sub> [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Contenido nominal (mg/kg)	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50+	35+

L: número de laboratorios.

n: número de valores individuales.

S<sub>r</sub>: desviación típica de la repetibilidad.

S<sub>R</sub>: desviación típica de la reproducibilidad.

CV<sub>r</sub>: coeficiente de variación de la repetibilidad, %.

CV<sub>R</sub>: coeficiente de variación de la reproducibilidad, %.

\* Contenido declarado por el fabricante.

+ Pienso preparado en el laboratorio.