

374L0203

22.4.74

Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων

Αριθ. Ν 108/7

ΠΕΜΠΤΗ ΟΔΗΓΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 25ης Μαρτίου 1974

περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων ανάλυσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(74/203/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

έκτοτε έργασιών, πρέπει να καθιερωθεί μία πέμπτη σειρά μεθόδων·

Έχοντας υπόψη:

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μονίμου Επιτροπής Ζωοτροφών,

τή συνθήκη περί ιδρύσεως της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

τήν οδηγία του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1970 περί εισαγωγής κοινοτικών τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την πράξη⁽²⁾ τή συννημένη στή συνθήκη περί προσχωρήσεως νέων Κρατών Μελών στην Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα και στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα Ατομικής Ένεργειας⁽³⁾, ή όποια υπεγράφη στίς Βρυξέλλες, τήν 22α Ιανουαρίου 1972, και ιδίως τό άρθρο 2,

Άρθρο 1

Τά Κράτη Μέλη καθορίζουν ότι οί αναλύσεις για τούς επίσημους έλέγχους των ζωοτροφών, όσον άφορά τήν περιεκτικότητα σέ άμυλο και σέ προϊόντα άποικοδομήσεως του άμύλου, μεγάλου μοριακού θάρους, στίς ζωοτροφές, οί όποιες περιέχουν τεμαχίδια, πούλπα, άποξηραμένα φύλλα ή «κορυφές» τεύτλων, πούλπα πατατών, άποξηραμένη ζύμη, προϊόντα πλούσια σέ ίνουλίνη ή υπόλοιπα τήξεως λίπους, πραγματοποιούνται σύμφωνα με τή μέθοδο ή όποια περιγράφεται στό παράρτημα Ι τής παρούσας οδηγίας.

Έκτιμώντας:

ότι ή άνωτέρω οδηγία προβλέπει ότι οί επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών, για να διαπιστωθεί άν τηρούνται οί προδιαγραφόμενες δυνάμει των νομοθετικών, κανονιστικών, ή διοικητικών διατάξεων προϋποθέσεις, για τήν ποιότητα και τή σύνθεση των ζωοτροφών, διενεργούνται σύμφωνα με τούς κοινοτικούς τρόπους δειγματοληψίας και τίς κοινοτικές μεθόδους ανάλυσεως·

Οί γενικές διατάξεις, που περιλαμβάνονται στό τμήμα 1 (είσαγωγή) του παραρτήματος τής πρώτης οδηγίας 71/250/ΕΟΚ τής Έπιτροπής τής 15ης Ιουνίου 1971 εφαρμόζονται στή μέθοδο που περιγράφεται στό παράρτημα Ι τής παρούσας οδηγίας.

Άρθρο 2

ότι οί οδηγίες αριθ. 71/250/ΕΟΚ, 71/393/ΕΟΚ, 72/199/ΕΟΚ και 73/46/ΕΟΚ τής Έπιτροπής τής 15ης Ιουνίου 1971⁽⁴⁾, τής 18ης Νοεμβρίου 1971⁽⁵⁾, τής 27ης Απριλίου 1972⁽⁶⁾ και τής 5ης Δεκεμβρίου 1972⁽⁷⁾ άντιστοιχώς έχουν ήδη καθορίσει έναν όρισμένο αριθμό κοινοτικών μεθόδων ανάλυσεως· ότι, λαμβανομένης υπόψη τής προόδου των πραγματοποιηθεισών

Τά Κράτη Μέλη καθορίζουν ότι οί αναλύσεις για τούς επίσημους έλέγχους των ζωοτροφών, όσον άφορά τήν περιεκτικότητά τους σέ amprolium, éthopabate, dinitolmide (DOT), nicarbazine και ménadione (βιταμίνη K₃), πραγματοποιούνται σύμφωνα με τίς μεθόδους, οί όποιες περιγράφονται στό παράρτημα ΙΙ τής παρούσας οδηγίας.

Οί γενικές διατάξεις, οί όποιες περιλαμβάνονται στό τμήμα 1 (είσαγωγή) του παραρτήματος τής πρώτης οδηγίας 71/250/ΕΟΚ τής Έπιτροπής τής 15ης Ιουνίου 1971 εκτός από τό μέρος τό όποιο άφορά τήν προετοιμασία του προς άνάλυση δείγματος, εφαρμόζονται στίς μεθόδους που περιγράφονται στό παράρτημα ΙΙ τής

⁽¹⁾ ΕΕ αριθ. Ν 170 τής 3.8.1970, σ. 2.

⁽²⁾ ΕΕ αριθ. Ν 73 τής 27.3.1972, σ. 14.

⁽³⁾ ΕΕ αριθ. Ν 73 τής 27.3.1972, σ. 5.

⁽⁴⁾ ΕΕ αριθ. Ν 155 τής 12.7.1971 σ. 13.

⁽⁵⁾ ΕΕ αριθ. Ν 279 τής 20.12.1971, σ. 7.

⁽⁶⁾ ΕΕ αριθ. Ν 123 τής 29.5.1972, σ. 6.

⁽⁷⁾ ΕΕ αριθ. Ν 83 τής 30.3.1973, σ. 21.

παρούσας ὁδηγίας.

Ἄρθρο 3

Τά Κράτη Μέλη θέτουν σέ ἰσχύ, τήν 1η Νοεμβρίου 1974 τὸ ἀργότερο, τίς νομοθετικές, κανονιστικές καί διοικητικές διατάξεις πού εἶναι ἀναγκαῖες γιά νά συμμορφωθοῦν πρὸς τήν παρούσα ὁδηγία. Ἐνημερώνουν σχετικά ἀμέσως τήν Ἐπιτροπή.

Ἄρθρο 4

Ἡ παρούσα ὁδηγία ἀπευθύνεται στά Κράτη Μέλη.

Ἐγινε στίς Βρυξέλλες, στίς 25 Μαρτίου 1974.

Γιά τήν Ἐπιτροπή

Ὁ Πρόεδρος

François-Xavier ORTOLI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ

— μέθοδος μέ παγκρεατίνη —

1. Ἀντικείμενο καί τομέας ἐφαρμογῆς

Ἡ μέθοδος ἐπιτρέπει τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος σέ ἄμυλο καί σέ προϊόντα ἀποικοδομήσεως τοῦ ἄμυλου μεγάλου μοριακοῦ θάρους στίς ζωοτροφές, οἱ ὁποῖες περιέχουν τεμαχίδια, πούλπα, ἀποξηραμένα φύλλα ἢ «κορυφές» τεύτλων, πούλπα πατατῶν, ἀποξηραμένη ζύμη, προϊόντα πλούσια σέ ἰνουλίνη (π.χ. τεμαχίδια καί ἄλευρο ψευδοκοκοκασίου) (ἡλίανθος κονδυλόρριζος) ἢ ὑπόλοιπα τήξεως λίπους. Ὁ προσδιορισμός γίνεται μόνο ὅταν ἡ μικροσκοπική ἐξέταση ἐμφανίσει τήν ὑπαρξή μέσα στό δείγμα σημαντικῶν ποσοτήτων ἄμυλου.

2. Ἀρχή

Τά εὐρισκόμενα μέσα στό δείγμα σάκχαρα ἀπομακρύνονται δι' ἐκχυλίσσεως μέ αἰθανόλη. Τό ἄμυλο τοῦ ὑπολείμματος τῆς ἐκχυλίσσεως σακχαροποιεῖται μέ παγκρεατίνη. Τά σάκχαρα ὑδρολύονται μέ ὕδροχλωρικό ὀξύ καί ἡ σχηματιζόμενη γλυκόζη προσδιορίζεται μέ τή μέθοδο Luff-Schoorl. Ἡ ποσότητα τῆς κατ' αὐτόν τόν τρόπο παραγομένης γλυκόζης, πολλαπλασιαζομένη ἐπὶ ἓνα σταθερό συντελεστή, δίδει τήν περιεκτικότητα τοῦ δείγματος σέ ἄμυλο.

3. Ἀντιδραστήρια

- 3.1. Αἰθανόλη 90 τοῖς ἑκατό (δ/δ), οὐδετέρα στή φαινολοφθαλεΐνη.
- 3.2. Ἀμυλική ἄλκοόλη p.a.
- 3.3. Τολουόλιο p.a.
- 3.4. Ρυθμιστικό διάλυμα: Διαλύονται σέ ὕδωρ 9,078 g δισοξίνου φωσφορικοῦ καλίου KH_2PO_4 καί 11,876 g ὀξίνου φωσφορικοῦ νατρίου $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Συμπληρώνεται ἕως 1 l μέ ὕδωρ.
- 3.5. Διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,2 N.
- 3.6. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σέ ὕδωρ 21,9 g ὀξικοῦ ψευδαργύρου $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ καί 3g ὀξικοῦ ὀξέος (glacial). Συμπληρώνεται μέχρι 100 ml μέ ὕδωρ.
- 3.7. Διάλυμα Carrez II: Διαλύονται σέ ὕδωρ 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Συμπληρώνεται μέχρι 100 ml μέ ὕδωρ.
- 3.8. Ὑδροχλωρικό ὀξύ N.
- 3.9. Ὑδροχλωρικό ὀξύ p.a., περίπου 8 N, d: 1,125.
- 3.10. Διάλυμα ὕδροξειδίου τοῦ νατρίου p.a., περίπου 10 N, d: 1,33.
- 3.11. Δείκτης: διάλυμα σέ 0,1% (θάρος/ὄγκο) ἡλιανθίνης (πορτοκαλόχρουν τοῦ μεθυλίου).
- 3.12. Παγκρεατίνη σέ σκόνη, ἀνταποκρινόμενη στίς προδιαγραφές, οἱ ὁποῖες δίδονται στό σημείο 8. Διατηρεῖται σέ κωματισμένα φιαλίδια προστατευμένα ἀπό τό φῶς καί τήν ὑγρασία.
- 3.13. Ἀντιδραστήρια κατὰ Luff-Schoorl: προστίθεται ἀναταράσσοντας προσεκτικά τό διάλυμα τοῦ κιτρικοῦ ὀξέος (3.13.2) μέσα στό διάλυμα τοῦ ἀνθρακικοῦ νατρίου (3.13.3). Προστίθεται κατόπιν τό διάλυμα τοῦ θειικοῦ χαλκοῦ (3.13.1) καί συμπληρώνεται μέχρι 1 l μέ ὕδωρ. Ἀφήνεται ἐπὶ μία νύκτα σέ ἡρεμία καί διηθεΐται. Ἐλέγχεται ἡ κανονικότητα τοῦ κατ' αὐτόν τόν τρόπο ληφθέντος ἀντιδραστηρίου (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2N). Τό pH τοῦ διαλύματος πρέπει νά εἶναι 9,4 περίπου.
 - 3.13.1. Διάλυμα θειικοῦ χαλκοῦ: διαλύονται 25 g θειικοῦ χαλκοῦ p.a. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ μέσα σέ 100 ml ὕδατος.
 - 3.13.2. Διάλυμα κιτρικοῦ ὀξέος: διαλύονται 50 g κιτρικοῦ ὀξέος p.a. $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ μέσα σέ 50 ml ὕδατος.
 - 3.13.3. Διάλυμα ἀνθρακικοῦ νατρίου: διαλύονται 143,8 g ἀνύδρου ἀνθρακικοῦ νατρίου p.a. μέσα σέ 300 ml περίπου θερμοῦ ὕδατος. Ἀφήνεται νά ψυχθεῖ.
- 3.14. Κόκκοι ἐλαφρόπετρας θρασμένοι σέ ὕδροχλωρικό ὀξύ, πλυμένοι μέ ὕδωρ καί στεγνωμένοι.
- 3.15. Διάλυμα 30% (θάρος/ὄγκο) ἰωδιούχου καλίου p.a.

- 3.16. Θεϊκό ὀξύ, 6 N περίπου, d: 1,18.
- 3.17. Διάλυμα θειοθεικοῦ νατρίου 0,1 N.
- 3.18. Διάλυμα ἀμύλου: προστίθεται μίγμα 5 g διαλυτοῦ ἀμύλου καί 30 ml ὕδατος σέ 1 l ζέοντος ὕδατος. Ζέεται ἐπὶ 3 λεπτά καί ἀφήνεται νά ψυχθεῖ. Παρασκευάζεται λίγο πρὶν ἀπὸ τή χρῆση.

4. Συσκευές

- 4.1. Συσκευή ἐκχυλίσσεως (βλ. σχῆμα) ἀποτελουμένη ἀπὸ:
 - 4.1.1. Μία κωνική φιάλη τῶν 500 ml μέ εὐρύ στόμιο·
 - 4.1.2. Ἐναν κάθετο ψυκτήρα προσαρμοσμένο στήν κωνική φιάλη μέ πῶμα·
 - 4.1.3. Ἐνα στέλεχος, τό ὁποῖο ὀλισθαίνει μέσα στόν κεντρικό σωλήνα τοῦ ψυκτήρα, καί τό ὁποῖο φέρεται στό κατώτερο ἄκρο του ἕνα ἄγκιστρο, μία λαβίδα γιά τή στερέωση τοῦ στελέχους·
 - 4.1.4. Ἐναν μεταλλικό ὑποδοχέα ὁ ὁποῖος θά κρεμαστεῖ στό ἄγκιστρο τοῦ στελέχους (4.1.3.) καί θά στηρίξει τή διηθητική χοάνη·
 - 4.1.5. Διηθητική χοάνη, ταχείας διηθήσεως: μέγιστο μέγεθος πόρων 90 ἕως 150 microns (π.χ. G1, χωρητικότητος περίπου 30 ml)·
 - 4.1.6. Διηθητικός χάρτης, κατάλληλος σέ σχῆμα καί μέγεθος γιά τή διηθητική χοάνη (4.1.5).
- 4.2. Ἐπωαστικός κλίβανος, ρυθμισμένος στούς 38 °C.
- 4.3. Ὀγκομετρικές φιάλες τῶν 200 ml, μέ κάθετο ψυκτήρα.
- 4.4. Ὀγκομετρικές φιάλες τῶν 100 ml, μέ κάθετο ψυκτήρα.

5. Τρόπος ἐργασίας

5.1. Προετοιμασία τοῦ δείγματος

Κονιοποιεῖται τό δείγμα, ἔτσι ὥστε νά περνᾷ ἀπὸ κόσκινο μεγέθους βροχίδων 0,5 mm (ISO κόσκινο τῶν R 565).

5.2. Ἐκχύλιση

Ζυγίζονται, μέ ἀκρίβεια 1 mg, 2g δείγματος καί εἰσάγονται στή διηθητική χοάνη (4.1.5), τῆς ὁποίας ὁ πυθμένας ἔχει προηγουμένως καλυφθεῖ μέ διηθητικό χάρτη (4.1.6) ἐμποτισμένο μέ αἰθανόλη (3.1). Εἰσάγονται στήν κωνική φιάλη (4.1.1) 55 ml αἰθανόλης (3.1) καί μερικοί κόκκοι ἐλαφρόπετρας (3.14). Τοποθετεῖται ἡ διηθητική χοάνη μέσα στόν μεταλλικό ὑποδοχέα (4.1.4) καί κρεμᾶται αὐτός στό ἄγκιστρο τοῦ στελέχους (4.1.3). Τοποθετεῖται ὁ ψυκτήρας στήν κωνική φιάλη καί χαμηλώνεται τό στέλεχος ἔτσι ὥστε ὁ πυθμένας τῆς χοάνης νά ἐφάπτεται τῆς ἐπιφανείας τῆς αἰθανόλης. Στερεώνεται τό στέλεχος στό ὕψος αὐτό μέ τή βοήθεια τῆς λαβίδος. Ζέεται ἡ αἰθανόλη ἐπὶ 3 ὥρες. Κατόπιν ἀφήνεται νά ψυχθεῖ καί ἀποσύρεται τό στέλεχος (4.1.3) ἔτσι ὥστε ἡ χοάνη νά ἀνέλθει ὅσο τό δυνατό ὑψηλότερα στήν κωνική φιάλη. Ἀφαιρεῖται προσεκτικά τό πῶμα τῆς κωνικῆς φιάλης καί ἀφήνεται νά τρέξουν 45 ml ὕδατος κατά μήκος τῶν παρεῶν τοῦ φιαλίδιου. Τοποθετεῖται πάλι ὁ ψυκτήρας στήν κωνική φιάλη καί διατηρεῖται ἡ διηθητική χοάνη 10 cm ἐπάνω ἀπὸ τή στάθμη τοῦ ὑγροῦ. Ζέεται τό ὑγρό ἐπὶ 3 ὥρες. Κατόπιν ἀφήνεται νά ψυχθεῖ, ἀφαιρεῖται τό πῶμα τῆς κωνικῆς φιάλης καί ἀποσύρεται ἡ χοάνη ἀπὸ τόν ὑποδοχέα.

5.3. Σακχαροποίηση καί ὑδρόλυση

Τοποθετεῖται ἡ χοάνη σέ μιά φιάλη κενοῦ καί ξηραίνεται κατόπιν ἀναρροφήσεως. Φέρεται τό ὑπόλοιπο τῆς ἐκχυλίσσεως σέ ἰγδίο καί λεπτοκονιοποιεῖται. Μεταγγίζεται ποσοτικά ἡ σκόνη μέ τή βοήθεια 60 ml περίπου ὕδατος μέσα σέ μιά ὀγκομετρική σφαιρική φιάλη τῶν 200 ml καί προστίθενται μερικές σταγόνες ἀμυλικῆς ἀλκοόλης (3.2). Προσαρμόζεται στή σφαιρική φιάλη ἕνας κάθετος ψυκτήρας. Ζέεται ἐπὶ μία ὥρα. Ἀφήνεται κατόπιν νά ψυχθεῖ καί ἀποσυνδέεται ὁ ψυκτήρας. Προστίθενται 25 ml ρυθμιστικοῦ διαλύματος (3.4), 250 mg παγκρεατίνης (3.12), 2,5 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου (3.5) καί 10 σταγόνες τολουολίου (3.3). Ἀναταράσσεται ἐπὶ 2 λεπτά, τοποθετεῖται ἡ σφαιρική φιάλη στόν ἐπωαστικό κλίβανο (4.2) καί διατηρεῖται ἐκεῖ ἐπὶ 21 ὥρες ἀναταράσσοντας ἀπὸ καιρό σέ καιρό. Ἀφήνεται κατόπιν νά ψυχθεῖ στή θερμοκρασία τοῦ περιβάλλοντος.

Προστίθενται 5 ml διαλύματος Carrez I (3.6) καί ἀναταράσσεται ἐπὶ 1 λεπτό. Προστίθενται κατόπιν 5 ml διαλύματος Carrez II (3.7) καί ἀναταράσσεται ἐκ νέου ἐπὶ 1 λεπτό. Συμπληρώνεται μέχρι τή χαραγὴ μέ ὕδωρ, ἀναδεύεται καί διηθεῖται. Λαμβάνονται μέ τό σιφώνιο 50 ml ἀπὸ τό διήθημα καί φέρονται σέ ὀγκομετρική σφαιρική φιάλη τῶν 100 ml (δύναται ἐπίσης νά γίνη ἡ δοκιμασία ἐπὶ 100 ml διηθήματος σέ ὀγκομετρική σφαιρική φιάλη τῶν 200 ml).

Προστίθενται μερικές σταγόνες δείκτη (3.11) και όξινίζεται με υδροχλωρικό όξύ 8 N (3.9) έως ότου αρχίσει να μεταβάλλεται το χρώμα σε έρυθρό. Προστίθεται κατόπιν περίσσεια 6,25 ml υδροχλωρικού οξέος 8 N (3.9) (12,50 ml αν εργάζεται κανείς με 100 ml διηθήματος). Προσαρμόζεται ή σφαιρική φιάλη στον κάθετο ψυκτήρα, και ζέεται το διάλυμα επί 1 ώρα. Αφήνεται να ψυχθεί, εξουδετερώνεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 10 N (3.10) μέχρι μεταβολής του χρώματος του δείκτη σε κίτρινο. Όξινίζεται κατόπιν ελαφρά προσθέτοντας λίγο υδροχλωρικό όξύ N (3.8), συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με ύδωρ και αναδεύεται. Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε γλυκόζη σύμφωνα με τη μέθοδο Luff-Schoorl όπως ορίζεται στην 5.4.

5.4. Τιτλοδότηση κατά Luff-Schoorl

Λαμβάνονται με σιφόνιο 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (3.13) και φέρονται σε κωνική φιάλη των 300 ml. Προστίθενται 25 ml, μετρηθέντα ακριβώς, από το διάλυμα που ελήφθη στην 5.3 και που περιέχει κατ' ανώτατο όριο 60 mg γλυκόζης. Προστίθενται 2 κόκκοι ελαφρόπετρας (3.14), θερμαίνεται αναταράσσοντας με το χέρι, σε φλόγα μέσου ύψους και ζέεται το υγρό επί 2 λεπτά περίπου. Τοποθετείται άμέσως ή κωνική φιάλη επάνω σε μεταλλικό πλέγμα εφοδιασμένο με όθονη αμιάντου, ή όποια φέρει όπή διαμέτρου 6 cm περίπου, και κάτω από την όποια υπάρχει αναμμένη φλόγα. Αυτή είναι ρυθμισμένη ώστε μόνον ο πυθμένας της κωνικής φιάλης να θερμαίνεται. Προσαρμόζεται κατόπιν στην κωνική φιάλη ένας κάθετος ψυκτήρας. Ζέεται επί 10 λεπτά ακριβώς, ψύχεται άμέσως εντός ψυχρού ύδατος και μετά από 5 λεπτά περίπου τιτλοδοτείται ως εξής:

Προστίθενται 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.15) και άμέσως κατόπιν με προσοχή (έξ αιτίας του κινδύνου σχηματισμού αφθόνου αφροδ) 25 ml θειικού οξέος 6 N (3.16). Τιτλοδοτείται κατόπιν με διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 N (3.17) μέχρι να εμφανισθεί βαθύ κίτρινο χρώμα, προστίθεται ο δείκτης αμύλου και συμπληρώνεται η τιτλοδότηση.

Πραγματοποιείται ή ίδια τιτλοδότηση σε μίγμα ακριβώς μετρηθέν, 25 ml αντιδραστηρίου Luff-Schoorl (3.13) και 25 ml ύδατος, αφού προστεθούν 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.15) και 25 ml θειικού οξέος 6 N (3.16), παραλείποντας το βρασμό.

5.5. «Τυφλό» πείραμα

Πραγματοποιείται «τυφλό» πείραμα, ακολουθώντας τον τρόπο εργασίας ό όποιος περιγράφεται στην 5.3 και 5.4, απουσία δείγματος.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Υπολογίζεται με τη βοήθεια του πίνακα, ή ποσότητα της γλυκόζης σε mg ή όποια αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των 2 τιτλοδοτήσεων (εκφραζομένων σε ml θειοθειικού νατρίου 0,1 N) και που αναφέρεται αφ' ενός μόν στην ανάλυση του δείγματος και αφ' άλλου στο τυφλό πείραμα.

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα σε άμυλο του δείγματος δίδεται από τον τύπο:

$$0,72 (a - b)$$

στον όποιο:

a = mg γλυκόζης αναφερομένης στο δείγμα·

b = mg γλυκόζης αναφερομένης στο «τυφλό πείραμα» (βλέπε παρατήρηση 7.2.).

7. Παρατηρήσεις:

7.1 Η ταυτόχρονη παρουσία στο δείγμα αμύλου, μερικώς ή όλικώς δεξτρινποιημένου και λακτόζης, δύναται να δώσει αποτέλεσμα υπερβάλλον κατά 0,5-3% σε άμυλο. Στην περίπτωση αυτή ή πραγματική περιεκτικότητα σε άμυλο εύρσκεται ως εξής:

- προσδιορίζεται ή περιεκτικότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος σε αναγωγικά σάκχαρα, τά όποια ελήφθησαν στην 5.2 και εκφράζεται τό αποτέλεσμα σε γλυκόζη επί τοις εκατό·
- προσδιορίζεται ή περιεκτικότητα του αιθανολικού εκχυλίσματος σε αναγωγικά σάκχαρα, τά όποια ελήφθησαν στην 5.2 και εκφράζεται τό αποτέλεσμα σε γλυκόζη επί τοις εκατό·
- αφαιρείται τό λαμβανόμενο αποτέλεσμα στην α) από αυτό τό όποιο ελήφθη στη β) και πολλαπλασιάζεται ή διαφορά επί 0,9·
- αφαιρείται ή λαμβανόμενη τιμή στη γ) από την περιεκτικότητα σε άμυλο, ή όποια ελήφθη εφαρμόζοντας τη μέθοδο και υπολογίζοντας όπως υποδεικνύεται στην 6.

7.2 Η ποσότητα της γλυκόζης, ή όποια αναφέρεται στο «τυφλό» πείραμα ανέρχεται κανονικά σε 0,25 mg. Δεν δύναται να είναι ανωτέρα του 0,50 mg.

8. Προδιαγραφές που αφορούν την παγκρεατίνη

Περιγραφή: Κόνις λευκοκτρίνη άμορφη.

Περιεκτικότητα σε γλυκόζη: Η ποσότητα της γλυκόζης του τυφλού πειράματος (βλ. 5.5) είναι κανονικά 0,25 mg. Ένα αποτέλεσμα ανώτερο του 0,50 mg αποδεικνύει ότι η παγκρεατίνη δεν είναι πλέον χρησιμοποιήσιμη.

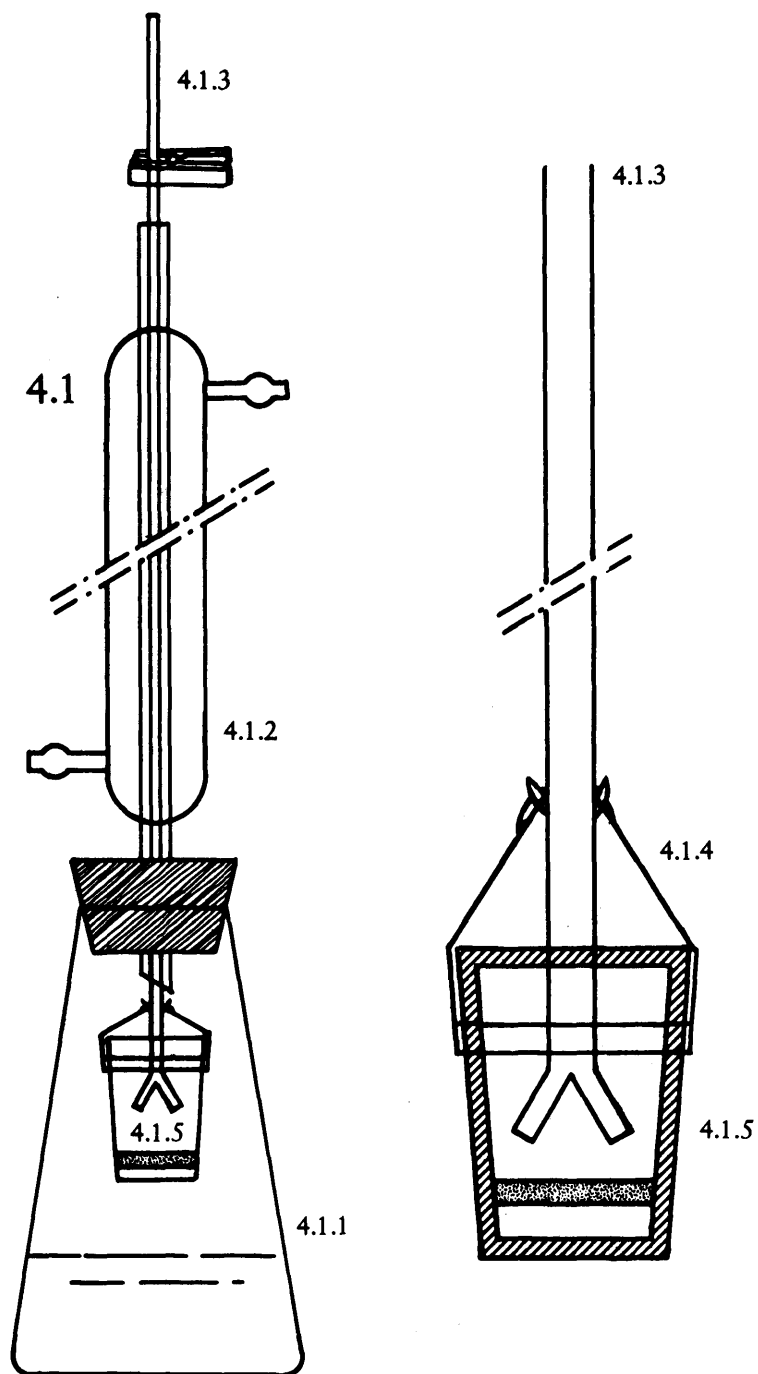
Έλεγχος καταναλώσεως ιωδίου: Παρασκευάζεται εναιώρημα 62,5 mg παγκρεατίνης εντός 50 ml ύδατος περίπου το οποίο θερμαίνεται στους 25-30 °C. Προστίθεται 1 ml διαλύματος ιωδίου 0,1 N. Αναδεύεται επί 2 λεπτά. Τιτλοδοτείται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 N, παρουσία δείκτου άμυλου. Η κατανάλωση του διαλύματος του ιωδίου από την παγκρεατίνη δεν πρέπει να υπερβεί το 0,5 ml.

Έλεγχος της άμολολυτικής δραστηριότητας: Αναμιγνύονται 100 ml διαλύματος άμυλου (3.18), 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος (3.4), 0,5 ml διαλύματος χλωριούχου νατρίου (3.5) και 62,5 mg παγκρεατίνης. Θερμαίνεται το μίγμα στους 25-30 °C και αναδεύεται επί 2 λεπτά. Προστίθεται 1 ml διαλύματος ιωδίου 0,1 N. Ο κυανούς χρωματισμός πρέπει να εξαφανισθεί μέσα στα 15' λεπτά που ακολουθούν, μετά την προσθήκη του διαλύματος ιωδίου.

Πίνακας τιμών για 25 ml αντιδραστηρίου Luff-Schoorl

ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N · 2 λεπτά θέρμανση· 10 λεπτά βρασμός

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N	Γλυκόζη, φρουκτόζη, ιμθερτο- σάκχαρο $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Λακτόζη $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Μαλτόζη $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
ml	mg	Διαφορά	mg	Διαφορά	mg	Διαφορά	ml
1	2·4		3·6		3·9		1
2	4·8	2·4	7·3	3·7	7·8	3·9	2
3	7·2	2·4	11·0	3·7	11·7	3·9	3
4	9·7	2·5	14·7	3·7	15·6	3·9	4
5	12·2	2·5	18·4	3·7	19·6	4·0	5
6	14·7	2·5	22·1	3·7	23·5	3·9	6
7	17·2	2·5	25·8	3·7	27·5	4·0	7
8	19·8	2·6	29·5	3·7	31·5	4·0	8
9	22·4	2·6	33·2	3·7	35·5	4·0	9
10	25·0	2·6	37·0	3·8	39·5	4·0	10
11	27·6	2·6	40·8	3·8	43·5	4·0	11
12	30·3	2·7	44·6	3·8	47·5	4·0	12
13	33·0	2·7	48·4	3·8	51·6	4·1	13
14	35·7	2·7	52·2	3·8	55·7	4·1	14
15	38·5	2·8	56·0	3·8	59·8	4·1	15
16	41·3	2·8	59·9	3·9	63·9	4·1	16
17	44·2	2·9	63·8	3·9	68·0	4·1	17
18	47·1	2·9	67·7	3·9	72·2	4·2	18
19	50·0	2·9	71·7	4·0	76·5	4·3	19
20	53·0	3·0	75·7	4·0	80·9	4·4	20
21	56·0	3·0	79·8	4·1	85·4	4·5	21
22	59·1	3·1	83·9	4·1	90·0	4·6	22
23	62·2	3·1	88·0	4·1	94·6	4·6	23



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ AMPROLIUM

[Ύδροχλωρική χλωριούχος 1-(4-άμινο-2-προπυλο-5-πυριμιδυλομέθυλο)-2-πικολίνη]
[Chlorhydrate de chlorure 1-(4-amino-2-propyl-5-pyrimidylméthyl-2-picolinium)]

1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του amprolium στις ζωοτροφές, στα συμπυκνώματα ζωοτροφών και στα προμείγματα. Το κατώτατο όριο του προσδιορισμού είναι 40 ppm.

2. Αρχή

Τό δείγμα εκχυλίζεται με διάλυμα άραιωμένης μεθανόλης. Τό εκχύλισμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με στήλη οξειδίου του άργιλιού και κατεργάζεται με μεθανολικό διάλυμα 2,7-διυδροξυναφθαλινίου, σιδηροκυανιούχου καλίου, κυανιούχου καλίου και υδροξειδίου του νατρίου. Εμφανίζεται πορφυρή χροιά. Τό amprolium προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο στά 530 nm.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Μεθανόλη p.a.
- 3.2. Διάλυμα μεθανόλης: Αναμιγνύονται 2 όγκοι μεθανόλης (3.1) με έναν όγκο ύδατος.
- 3.3. Διάλυμα 0,2% (βάρος/όγκο) σιδηροκυανιούχου καλίου $K_3 Fe(CN)_6$ p.a. Τό διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό επί 2 εβδομάδες.
- 3.4. Διάλυμα 1% (βάρος/όγκο) κυανιούχου καλίου p.a. Τό διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό επί 2 εβδομάδες.
- 3.5. Διάλυμα 1,125% (βάρος/όγκο) υδροξειδίου του νατρίου p.a.
- 3.6. Μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου: Λαμβάνονται 15 ml διαλύματος (3.5) και συμπληρώνονται μέχρι τά 2 ml με μεθανόλη (3.1).
- 3.7. Διαλύματα 0,0025% (βάρος/όγκο) 2,7-διυδροξυναφθαλινίου: Διαλύονται 25 mg 2,7-διυδροξυναφθαλινίου p.a. στή μεθανόλη (3.1) και συμπληρώνονται μέχρι τά 1 000 ml με μεθανόλη (3.1).
- 3.8. Αντιδραστήριο χρωματισμού: Εισάγονται 90 ml διαλύματος 2,7-διυδροξυναφθαλινίου (3.7) σε κωνική φιάλη των 250 ml (4.1), προστίθενται 5 ml διαλύματος σιδηροκυανιούχου καλίου (3.3) και αναδεύονται καλά. Προστίθενται κατόπιν 5 ml διαλύματος κυανιούχου καλίου (3.4), πωματίζεται ή φιάλη και αναδεύεται. Αφήνεται σε ήρεμία επί 30-35 λεπτά, προστίθενται 100 ml μεθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6), αναδεύεται και διηθείται σε διηθητική χοάνη (4.3). Χρησιμοποιείται τό αντιδραστήριο αυτό σε 75 λεπτά από τό τέλος τής διηθήσεως.
- 3.9. Όξειδιο του άργιλιού για χρωματογραφία σε στήλη. Πρίν από τή χρήση ανακινούνται επί 30 λεπτά 100 g οξειδίου του άργιλιού με 500 ml ύδατος, διηθούνται, εκκένεται 3 φορές τό παραμένον επί του ήθμου υπόλειμμα με 50 ml μεθανόλης (3.1) κάθε φορά, ξηραίνεται υπό κενό, αφήνεται νά ήρεμήσει επί μία νύκτα και ξηραίνεται επί 2 ώρες στους 100 °C σε κλίβανο υπό κενό. Αφήνεται νά ψυχθεί μέσα σε ξηραντήρα. Ελέγχεται ή δραστητικότητα υποβάλλοντας σε ανάλυση από τό σημείο 5.2 μία όρισμένη ποσότητα του διαλύματος γνωστής συγκέντρώσεως (πρότυπον-standard) (3.11). Τό ποσοστό του λαμβανομένου amprolium όφείλει νά είναι 100% $\pm$ 4%.
- 3.10. Ουσία για παρασκευή του προτύπου διαλύματος: amprolium καθαρό τό όποιο ανταποκρίνεται στά κατωτέρω χαρακτηριστικά:
Σημείο τήξεως (άποσυνθέσεως): 248 °C.
Συντελεστής μοριακής άποσθένσεως στά 265 και 235 nm σε άλεσταγμένο ύδωρ: $11,0 \times 10^3$.
- 3.11. Πρότυπο διάλυμα: Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg τής προτύπου ουσίας (3.10). Διαλύονται στό διάλυμα μεθανόλης (3.2) μέσα σε σφαιρική όγκομετρική φιάλη των 500 ml, συμπληρώνονται μέχρι τή χαραγή με τόν ίδιο διαλύτη και όμογενοποιούνται. Λαμβάνονται 10,0 ml, συμπληρώνονται μέχρι τά 50 ml με τό διάλυμα μεθανόλης (3.2) μέσα σε σφαιρική όγκομετρική φιάλη και όμογενοποιούνται. 1ml αυτού του διαλύματος περιέχει 20 mg amprolium.

4. Συσκευές

- 4.1. Κωνικές φιάλες των 50, 250 και 500 ml με έσυρισμένα πώματα.
- 4.2. Αναδευτήρας.
- 4.3. Διηθητική χοάνη, πορώδους G3, διαμέτρου: 60 mm.
- 4.4. Ύαλινος σωλήνας χρωματογραφίας (έσωτερική διάμετρος: 9 mm μήκος: 400-500 mm).
- 4.5. Φυγόκεντρος με σωλήνες των 25 ml και με έσυρισμένα πώματα.
- 4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες πάχους 10 mm.

5. Τρόπος εργασίας

5.1. Έκχύλιση και καθαρισμός

5.1.1. Ζωοτροφές και προμύγματα

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, 10 g δείγματος λεπτά διαμερισμένου και όμογενοποιημένου. Για τα προμύγματα ζυγίζονται 3 έως 6 g, με ακρίβεια 1 mg. Εισάγεται ή ποσότητα του δείγματος μέσα σε κωνική φιάλη των 250 ml (4.1) και προστίθενται 100 ml ακριβώς διαλύματος μεθανόλης (3.2). Ανακινούνται επί 60' λεπτά και διηθούνται. Αραιώνεται εάν είναι αναγκαίο με άραιη μεθανόλη (3.2), ώστε να ληφθεί διάλυμα που να περιέχει 5-15 µg amprolium ανά ml.

Εισάγονται μέσα σε σωλήνα χρωματογραφίας (4.4), ο οποίος φέρει στο κατώτερο άκρο του πώμα από βαμβάκι, 5 g οξειδίου του αργιλίου (3.9) και κατόπιν 25,0 ml εκχυλίσματος. Αφήνεται να ρεύσει το υγρό, απορρίπτονται τα 5 πρώτα ml και συλλέγονται τα έποµενα 12 ml μέσα σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα.

5.1.2. Συμπυκνώματα ζωοτροφών

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, 0,5 g δείγματος λεπτός διαμερισθέντος και όμογενοποιηθέντος, φέρονται μέσα σε κωνική φιάλη των 500 ml (4.1), προστίθενται 250 ml διαλύματος μεθανόλης (3.2), ανακινείται ή φιάλη επί 60 λεπτά και το μίγμα διηθείται. Παραλαμβάνονται 5,0 ml διηθήματος και συμπληρώνονται μέχρι τα 200 ml με διάλυμα μεθανόλης (3.2) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη.

5.2. Ανάπτυξη της χρώσεως και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

Λαμβάνονται 5,0 ml από το διάλυμα το οποίο ελήφθη στην 5.1.1 ή στην 5.1.2 και εισάγονται μέσα σε φυγόκεντρικό σωλήνα Α (4.5). Μέσα σε φυγόκεντρικό σωλήνα Β (4.5) φέρονται 5,0 ml διαλύματος αραιωμένης μεθανόλης (3.2). Προστίθενται μέσα σε κάθε σωλήνα 10,0 ml αντιδραστηρίου χρώσεως (3.8), πωματίζονται οι σωλήνες, όμογενοποιούνται και αφήνονται σε ήρεμία επί 18 λεπτά. Φυγόκεντρούνται κατόπιν επί 3 λεπτά ώστε να ληφθούν διαιγρή διαλύματα και μεταγγίζονται τα διαλύματα Α και Β μέσα σε κωνικές φιάλες των 50 ml (4.1).

Μετράται άµεσως στο φασματοφωτόμετρο, στά 530 nm ή οπτική πυκνότητα του διαλύματος Α, χρησιμοποιώντας σαν «τυφλό» το διάλυμα Β. Προσδιορίζεται ή ποσότητα του amprolium, με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.3).

5.3. Καμπύλη αναφοράς

Εισάγονται μέσα στους φυγόκεντρικούς σωλήνες (4.5) αντίστοιχως 1,0 – 2,0 – 3,0 – 4,0 και 5,0 ml του προτύπου διαλύματος (3.11). Συμπληρώνεται ο όγκος των τεσσάρων πρώτων σωλήνων μέχρι τα 5,0 ml με το μεθανολικό διάλυμα (3.2). Προστίθενται μέσα στους πέντε σωλήνες 10,0 ml αντιδραστηρίου χρωματισμού (3.8), πωματίζονται οι σωλήνες, όμογενοποιούνται και αφήνονται σε ήρεμία επί 18 λεπτά. Φυγόκεντρούνται κατόπιν επί 3 λεπτά και μεταγγίζονται τα διαλύματα μέσα σε κωνικές φιάλες των 50 ml (4.1).

Μετράται άµεσως στο φασματοφωτόμετρο, στά 530 nm, ή οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων χρησιμοποιώντας σαν «τυφλό» ένα μίγμα 5 ml αραιωμένης μεθανόλης (3.2) και 10 ml αντιδραστηρίου χρωματισμού (3.8). Χαράσσεται ή καμπύλη αναφοράς φέροντας στον άξονα των τεταγμένων τις τιμές της οπτικής πυκνότητας και άξονα των τετμημένων τις αντίστοιχες ποσότητες του amprolium σε mg.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

6.1. Ζωοτροφές και προμύγματα

Η περιεκτικότητα σε mg amprolium ανά kg δείγματος δίδεται από τον τύπο

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 20\,000$$

όπου:

A = ποσότης σε mg του amprolium, προσδιορισθείσα φωτομετρικώς

P = βάρος σε g του δείγματος

F = συντελεστής αραιώσεως (ένδεχομένως πραγματοποιηθείσα στην 5.1.1).

6.2. Συμπυκνώματα ζωοτροφών

Η περιεκτικότητα σε amprolium επί τοις εκατό του δείγματος δίδεται από τον τύπο

$$\frac{A}{P} \cdot 200$$

όπου:

A = ποσότης σε mg του amprolium προσδιορισθέντος φωτομετρικώς

P = βάρος σε g του πρὸς δοκιμή δείγματος.

7. Έπαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων 2 παραλλήλων προσδιορισμών, πραγματοποιηθέντων επί του ίδιου δείγματος, δέν πρέπει νά υπερβαίνει:

10 ppm, σε απόλυτο τιμή, γιά περιεκτικότητες σε amprolium κατώτερες τῶν 100 ppm,

τό 10%, σε σχετική τιμή, γιά περιεκτικότητες μεταξύ 100 καί 5 000 ppm,

500 ppm, σε απόλυτο τιμή, γιά περιεκτικότητες μεταξύ 5 000 καί 10 000 ppm,

τό 5%, σε σχετική τιμή, γιά περιεκτικότητες ανώτερες τῶν 10 000 ppm.

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΘΟΡΑΒΑΤΕ

(Μεθυλικός εστέρας του 4-άκεταμιδο-2-αιθοξυ-βενζοϊκού οξέος)
(méthyl-4-acétamido-2-éthoxybenzoate)

1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του éthorabate στις ζωοτροφές, στα συμπυκνώματα ζωοτροφών και στα προμύγματα. Το κατώτερο όριο του προσδιορισμού είναι 2 ppm.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με άραιωμένη μεθανόλη. Το διάλυμα όξινίζεται και εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο. Το εκχύλισμα με χλωροφόρμιο εκπλύνεται πρώτα με αλκαλικό διάλυμα και έπειτα με ύδωρ. Το καθαρισμένο εκχύλισμα συμπυκνώνεται, τό éthorabate υδρολύεται με άραιο ύδροχλωρικό όξύ. Το άμινικό παράγωγο τό οποίο σχηματίζεται κατ' αυτόν τον τρόπο ένώνεται με τό άζωτο και συζεύγνυται με τη Ν-(1-ναφθυλο) αϊθυλενοδιανίνη (N-(naphthyl) -ethylenediamine). Τό κεχρωσμένο σύμπλοκο εκχυλίζεται με βουτανόλη και ή όπτική πυκνότητα του διαλύματος μετράται στά 555 nm.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Μεθανόλη p.a.
- 3.2. Μεθανόλη 50% (όγκος/όγκο): Αναμιγνύονται ίσοι όγκοι μεθανόλης (3.1) και ύδατος.
- 3.3. Ύδροχλωρικό όξύ p.a., d: 1,19.
- 3.4. Ύδροχλωρικό όξύ άραιωμένο στό 1/10: Λαμβάνονται 10,0 ml ύδροχλωρικού όξέος (3.3) και συμπληρώνονται μέχρι τά 100 ml με ύδωρ.
- 3.5. Ύδροχλωρικό όξύ 0,3 N περίπου: Λαμβάνονται 25,0 ml ύδροχλωρικού όξέος (3.3) και συμπληρώνονται μέχρι τά 1 000 ml με ύδωρ.
- 3.6. Χλωροφόρμιο p.a.
- 3.7. Διάλυμα 4% (θάρος/όγκο) p.a. άνθρακικού νατρίου: Διαλύονται 40,0 g άνύδρου άνθρακικού νατρίου p.a. σέ ύδωρ και συμπληρώνονται μέχρι τά 1 000 ml με ύδωρ.
- 3.8. Διάλυμα 0,2% (θάρος/όγκο) νιτρώδους νατρίου: Διαλύονται σέ ύδωρ 100 mg νιτρώδους νατρίου p.a. και συμπληρώνονται μέχρι τά 50 ml με ύδωρ μέσα σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται άμέσως πρίν από τη χρήση.
- 3.9. Διάλυμα 1,0% (θάρος/όγκο) σουλφαινικού άμμωνίου: Διαλύονται σέ ύδωρ 500 mg σουλφαινικού άμμωνίου p.a. και συμπληρώνονται στά 50 ml με ύδωρ μέσα σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται άμέσως πρίν από τη χρήση.
- 3.10. Διάλυμα 0,2% (θάρος/όγκο), Ν-(1-ναφθυλο) αϊθυλενοδιαμίνης, Ν-(1-naphthyl) éthylenediamine: Διαλύονται σέ ύδωρ 100 mg Ν-(1-naphthyl) éthylenediamine p.a. και συμπληρώνονται στά 50 ml με ύδωρ μέσα σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη. Παρασκευάζεται άμέσως πρίν από τη χρήση.
- 3.11. Άνυδρο χλωριούχο νάτριο p.a.
- 3.12. n-βουτανόλη p.a.
- 3.13. Ουσία γιά παρασκευή προτύπου διαλύματος: éthorabate καθαρό.
- 3.14. Πρότυπα διαλύματα:
 - 3.14.1 Διάλυμα 0,040 mg éthorabate ανά ml: Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 40 g προτύπου ουσίας (3.13). Διαλύονται με άραιωμένη μεθανόλη (3.2) σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη τών 100 ml, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με τόν ίδιο διαλύτη και όμογενοποιούνται. Λαμβάνονται 10,0 ml, συμπληρώνονται στά 100 ml με μεθανόλη (3.2) μέσα σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη και όμογενοποιούνται. Τό διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό επί ένα μήνα.
 - 3.14.2 Διάλυμα 0,016 mg éthorabate ανά 20 ml: Λαμβάνονται 5,0 ml διαλύματος (3.14.1), συμπληρώνονται στά 250 ml με άραιωμένη μεθανόλη (3.2) μέσα σέ όγκομετρική σφαιρική φιάλη και όμογενοποιούνται. Παρασκευάζεται άμέσως πρίν από τη χρήση.

4. Συσκευές

- 4.1. Κωνικές φιάλες τών 250 ml με έσφυρισμένο πώμα.

- 4.2. Διαχωριστικές χοάνες τῶν 100 ml μέ ἐσφυρισμένο πῶμα.
- 4.3. Ἀναδευτήρας.
- 4.4. Συσκευή ἐξατμίσεως ὑπὸ κενό μέ περιστρεφόμενη σφαιρική φιάλη τῶν 250 ml.
- 4.5. Ὑδρόλουτρο.
- 4.6. Φυγόκεντρος μέ σωλήνες τῶν 15 καὶ 50 ml, μέ ἐσφυρισμένα πῶματα.
- 4.7. Ψυκτήρας ἀέρας.
- 4.8. Φασματοφωτόμετρο μέ κυψελίδες πάχους 10 mm.

5. Τρόπος ἐργασίας

5.1. Ἐκχύλιση

Ζυγίζεται μέ ἀκρίβεια 1 mg ποσότητα δείγματος λεπτά διαμερισμένου καὶ ὁμογενοποιημένου περιέχοντος 80 mg περίπου ἑθορabaτε. Εἰσάγεται τὸ δείγμα σέ κωνική φιάλη τῶν 250 ml (4.1) καὶ προστίθενται 100,0 ml ἀραιωμένης μεθανόλης (3.2). Ἀναμιγνύονται, πωματίζεται ἡ φιάλη καὶ ἀναδεύεται ἐπὶ 1 ὥρα μέ τὴ βοήθεια ἑνὸς ἀναδευτήρα (4.3). Ἀφήνεται νά ἡρεμήσει, διηθεῖται καὶ ἀπορρίπτονται τὰ πρῶτα ml τοῦ διηθήματος.

5.2. Καθαρισμός

Σημείωση: Ὅλες οἱ ἐργασίες οἱ ὁποῖες ἀναφέρονται στό σημεῖο αὐτὸ πρέπει νά πραγματοποιηθοῦν ταχέως.

Εἰσάγονται 20,0 ml διαυγοῦς ἐκχυλίσματος μέσα σέ διαχωριστική χοάνη τῶν 100 ml (4.2). Προστίθενται 5,0 ml ὕδροχλωρικοῦ ὀξέος ἀραιωμένου στό 1/10 (3.4) καὶ 20,0 ml χλωροφορμίου (3.6). Ἀναδεύονται στήν ἀρχή μέ προσοχή καὶ κατόπιν δραστικά ἐπὶ 3 λεπτά. Ἀφήνεται νά ἡρεμήσει μέχρι διαχωρισμοῦ τῶν στιβάδων καὶ συλλέγεται ἡ στιβάδα τοῦ χλωροφορμίου μέσα σέ μία δεύτερη διαχωριστική χοάνη τῶν 100 ml (4.2).

Ἐκχυλίζεται ἡ ὀξινη στιβάδα δύο φορές διαδοχικά μέ 20,0 ml χλωροφορμίου (3.6) κάθε φορά. Συλλέγονται τὰ ἐκχυλίσματα τοῦ χλωροφορμίου στή δεύτερη διαχωριστική χοάνη καὶ ἀπομακρύνεται ἡ ὀξινη στιβάδα. Προστίθενται στό διάλυμα χλωροφορμίου 10 ml διαλύματος ἀνθρακικοῦ νατρίου (3.7), ἀναδεύεται ἐπὶ 3 λεπτά καὶ ἀφήνεται σέ ἡρεμία μέχρι διαχωρισμοῦ τῶν φάσεων. Συλλέγεται ἡ χλωροφορμική στιβάδα σέ μία τρίτη διαχωριστική χοάνη τῶν 100 ml (4.2) καὶ ἀπορρίπτεται ἡ ὕδατική στιβάδα. Προστίθενται στό διάλυμα χλωροφορμίου 10 ml διαλύματος ἀνθρακικοῦ νατρίου (3.7), ἀναδεύεται ἐπὶ 3 λεπτά καὶ ἀφήνεται νά ἡρεμήσει μέχρι διαχωρισμοῦ τῶν φάσεων.

Συλλέγεται ἡ χλωροφορμική στιβάδα σέ μία τέταρτη διαχωριστική χοάνη τῶν 100 ml (4.2), ἐκπλύνεται 2 φορές διαδοχικά, μέ 25 ml ὕδατος κάθε φορά, διαχωρίζονται οἱ ὕδατικές φάσεις καὶ συλλέγεται ποσοτικά τὸ χλωροφορμικὸ ἐκχύλισμα μέσα σέ σφαιρική φιάλη τῶν 250 ml (4.4). Συγκεντρώνονται οἱ ὕδατικές στιβάδες· ἐκπλένονται οἱ κενές διαχωριστικές χοάνες μέ μερικά ml χλωροφορμίου (3.6)· ἐκπλένεται κατόπιν ἡ ὕδατική στιβάδα μέ τὸ χλωροφόρμιο αὐτό. Διαχωρίζεται ἡ φάση τοῦ χλωροφορμίου καὶ προστίθεται στό ἐκχύλισμα τὸ ὁποῖο ἔχει συλλεγεῖ σέ μία σφαιρική φιάλη.

5.3. Ὑδρόλυση

Ἐξατμίζεται τὸ ἐκχύλισμα χλωροφορμίου μέχρι 2 ml περίπου, σέ ὑδρόλουτρο 50 °C, μέ τὴ βοήθεια τῆς συσκευῆς ἐξατμίσεως ὑπὸ κενό (4.4). Διαλύεται τὸ ὑπόλειμμα μέ 2 ἕως 3 ml μεθανόλης (3.1), μεταγγίζεται ποσοτικά τὸ διάλυμα μέσα σέ φυγόκεντρικὸ σωλήνα τῶν 50 ml (4.6) μέ τὴ βοήθεια δύο δόσεων τῶν 10 ml καὶ μιᾶς τῶν 5 ml ὕδροχλωρικοῦ ὀξέος 0,3 N περίπου (3.5). Προστίθενται μερικά τεμάχια ἐλαφρόπετρας, ὁμογενοποιοῦνται καὶ ὁ σωλήνας ἐφοδιάζεται μέ ψυκτὴρα ἀέρος (4.7). Βυθίζεται ὁ σωλήνας μέσα σέ ζέον ὑδρόλουτρο καὶ παραμένει ἐκεῖ ἐπὶ 45 λεπτά. Ἀφήνεται κατόπιν νά ψυχθεῖ σέ ρεῦμα ψυχροῦ ὕδατος.

5.4. Ἀνάπτυξη τοῦ χρώματος καὶ μέτρηση τῆς ὀπτικῆς πυκνότητος

Προστίθεται 1,0 ml διαλύματος νιτρώδους νατρίου (3.8), ἀνακινεῖται καὶ ἀφήνεται νά ἡρεμήσει ἐπὶ 2 λεπτά. Προστίθεται 1,0 ml διαλύματος σουλφαινικού ἀμμωνίου (3.9), ἀνακινεῖται καὶ ἀφήνεται σέ ἡρεμία ἐπὶ 2 λεπτά. Προστίθεται 1,0 ml διαλύματος N-(1-ναφθυλο) αἰθυλενοδιαμίνης N-(1-naphthyl) ethylenediamine (3.10), ἀνακινεῖται καὶ ἀφήνεται σέ ἡρεμία ἐπὶ 10 λεπτά. Προστίθενται 5,0 g χλωριούχου νατρίου (3.11) καὶ 10,0 ml βουτανόλης (3.12), ἀνακινεῖται ἰσχυρά μέχρις πλήρους διαλύσεως τοῦ χλωριούχου νατρίου.

Λαμβάνεται τὸ ἐπιπλέον διάλυμα βουτανόλης μέ τὴ βοήθεια σιφωνίου, εἰσάγεται σέ φυγόκεντρικὸ σωλήνα τῶν 15 ml (4.6) καὶ φυγόκεντρεῖται. Μετῶνται κατόπιν ἡ ὀπτική πυκνότητα E_A στό φασματοφωτόμετρο, στά 555 n.m. διὰ συγκρίσεως μέ τὴν n-βουτανόλη (3.12).

5.5. «Τυφλό» πείραμα

Πραγματοποιείται «τυφλό» πείραμα, ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο εργασίας, από το σημείο 5.2, με 20,0 ml αραιωμένης μεθανόλης (3.2). Μετράται η οπτική πυκνότητα E_B στα 555 nm διά συγκρίσεως με την n-βουτανόλη (3.12).

5.6. Δοκιμή με πρότυπο διάλυμα

Πραγματοποιείται ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο εργασίας, από το σημείο 5.2, με 20,0 ml προτύπου διαλύματος (3.14.2). Μετράται η οπτική πυκνότητα E_C στα 555 nm, διά συγκρίσεως με την n-βουτανόλη (3.12).

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε mg éthorabate ανά kg δείγματος δίδεται από τον τύπο

$$\frac{(E_A - E_B)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{80}{W}$$

όπου:

E_A = οπτική πυκνότητα του διαλύματος, το οποίο προέρχεται από το δείγμα.

E_B = οπτική πυκνότητα του διαλύματος που προκύπτει από το «τυφλό» πείραμα.

E_C = οπτική πυκνότητα του διαλύματος που προκύπτει από τη δοκιμή με πρότυπο διάλυμα.

P = βάρος σε g του δείγματος.

7. Έπαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παραλλήλων προσδιορισμών πραγματοποιούμενων επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει:

τό 20%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες του éthorabate κατώτερες των 7,5 ppm·

1,5 ppm, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 7,5 και 10 ppm·

τό 15%, σε σχετική τιμή για περιεκτικότητες μεγαλύτερες των 10 ppm.

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DINITOLMIDE (DOT) :

(3,5-δινιτρο-ο-τολουαμίδιο)
(3,5-dinitro-o-toluamide)

1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του dinitolmide (DOT) στις ζωτροφές, στα συμπυκνώματα ζωοτροφών και στα προμείγματα. Τα παράγωγα του νιτροφουρανίου υπεισέρχονται στον προσδιορισμό. Το κατώτατο όριο του προσδιορισμού είναι 40 ppm.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με άκετονιτρίλιο. Το εκχύλισμα καθαρίζεται σε στήλη οξειδίου του άργιλλίου και διηθείται. Μία ποσότητα του διηθήματος εξατμίζεται μέχρι ξηροῦ. Τό υπόλειμμα παραλαμβάνεται με διμεθυλοφορμαμίδη και κατεργάζεται με αιθυλενοδιαμίνη. Εμφανίζεται πορφυρός χρωματισμός. Τό dinitolmide προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο στο 560 nm.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Άκετονιτρίλιο 85% (όγκος/όγκος): Αναμιγνύονται 85 ml καθαρού άκετονιτρίλιου και 150 ml ύδατος. Τό μίγμα αποστάζεται πριν από τή χρήση. Συλλέγεται τό κλάσμα τής αποστάξεως μεταξύ 75 και 77 °C.
- 3.2. Όξειδιο του άργιλλίου, γιά χρωματογραφία σε στήλη. Πυρώνεται επί 2 ώρες τουλάχιστον στους 750 °C, ψύχεται σε ξηραντήρα και διατηρείται σε φιάλη εκ σκοτεινής ύαλου με έσφυρμένο πώμα. Πρίν από τή χρήση ύγραποιείται ως ακόλουθος: Εισάγονται σε φιάλη σκοτεινής ύαλου 10 g οξειδίου του άργιλλίου και 0,7 ml ύδατος, ή φιάλη πωματίζεται έρμητικά, θερμαίνεται επί 5 λεπτά σε ζέον ύδρόλουτρο ανακινώντας συγχρόνως ίσχυρά. Αφήνεται νά ψυχθεί ανακινώντας συνεχώς. Έλέγχεται ή δραστικότητα, υποβάλλοντας σε ανάλυση από τό σημείο 5.1, μία όρισμένη ποσότητα προτύπου διαλύματος (γνωστής συγκεντρώσεως) (3.6). Τό ποσοστό τής ανακτήσεως του dinitolmide πρέπει νά είναι 100% ± 2%.
- 3.3. Ν,N-διμεθυλοφορμαμίδη 95% (όγκος/όγκος): Αναμιγνύονται 95,0 ml. Ν,N-διμεθυλοφορμαμίδης p.a. και 5,0 ml ύδατος.
- 3.4. Αιθυλενοδιαμίνη p.a., μεγίστης περιεκτικότητας σε ύδωρ: 2,0%.
- 3.5. Πρότυπος ούσία: 3,5-δινιτρο-ο-τολουαμίδιο (3,5 dinitro-o-toluamide) καθαρό, ανταποκρινόμενο στα ακόλουθα χαρακτηριστικά:
σημείο τήξεως: 177 °C
συντελεστής μοριακής αποσθέσεως στα 248 nm σε άκετονιτρίλιο: $13,1 \times 10^3$
συντελεστής μοριακής αποσθέσεως στα 266 nm σε Ν,N-διμεθυλοφορμαμίδη $10,1 \times 10^3$.
- 3.6. Πρότυπο διάλυμα: Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 40 mg προτύπου ούσίας (3.5). Διαλύονται με άκετονιτρίλιο (3.1) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη των 200 ml, συμπληρώνεται μέχρι τή χαραγή με τόν ίδιο διαλύτη και όμογενοποιείται. Λαμβάνονται 20,0 ml, συμπληρώνονται μέχρι τά 100 ml με άκετονιτρίλιο (3.1) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη και όμογενοποιούνται. 1 ml του διαλύματος αυτού περιέχει 40 mg dinitolmide.

4. Συσκευές

- 4.1. Κωνική φιάλη 250 ml με έσφυρμένο πώμα.
- 4.2. Κάθετος ψυκτήρας.
- 4.2. Διηθητική χοάνη, πορώδους G3, διαμέτρου 60 mm.
- 4.4. Συσκευή διηθήσεως υπό κενό (π.χ. συσκευή του Witt)
- 4.5. Ύδρόλουτρο ρυθμισμένο στους 50 °C.
- 4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες πάχους 10 mm.

5. Τρόπος εργασίας

5.1. Εκχύλιση και καθαρισμός

Ζυγίζονται με ακρίβεια 1 mg 10 g του δείγματος λεπτά διαμερισμένου και όμογενοποιημένου. Γιά τά συμπυκνώματα και τά προμείγματα, ζυγίζεται 1 g, με ακρίβεια 1 mg. Εισάγεται τό δείγμα σε μία κωνική φιάλη των 250 ml (4.1) και προστίθενται 65 ml άκετονιτρίλιου (3.1).

Αναμιγνύονται, προσαρμόζεται στην κωνική φιάλη κάθετος ψυκτήρας (4.2) και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο (4.5) επί 30 λεπτά, ανακινώντας συνεχώς. Κατόπιν ψύχεται διά ρέοντος ύδατος. Προστίθενται 20 g οξειδίου του άργιου (3.2), ανακινείται επί 3 λεπτά και αφήνεται να ηρεμήσει. Τοποθετείται μία όγκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml στη συσκευή διηθήσεως (4.4), προσαρμόζεται ή διηθητική χοάνη (4.3) και το υγρό διηθείται υπό κενό. Μεταγγίζεται κατόπιν το ίζημα στη χοάνη με τη βοήθεια μερικών ml άκετονιτρίλιου (3.1) και εφαρμόζεται πάλι κενό. Διακόπτεται ή διήθηση υπό κενό, επανακατεργάζεται το ίζημα με μερικά ml άκετονιτρίλιου (3.1) και εφαρμόζεται το κενό εκ νέου. Οι τελευταίες αυτές εργασίες επαναλαμβάνονται μέχρις ότου ο όγκος του διηθήματος φθάσει τα 95 ml περίπου. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 ml με άκετονιτρίλιο (3.1) και ομογενοποιείται. Αν είναι αναγκαίο, λαμβάνεται ένα μέρος και αραιώνεται με άκετονιτρίλιο (3.1) ώστε να ληφθεί διάλυμα που να περιέχει 5 ως 15 mg dinitolmide ανά ml.

5.2.. Ανάπτυξη του χρωματισμού και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

Εισάγονται αντίστοιχα σε τρία ποτήρια ζέσεως των 50 ml, A, B και C, 4,0 ml του διαλύματος το οποίο ελήφθη στην 5.1. Προστίθεται εξ άλλου, στο ποτήρι C μόνο, 1,0 ml προτύπου διαλύματος (3.6). Φέρονται τα τρία ποτήρια στο υδρόλουτρο (4.5), τοποθετούνται κάτω από καλά αεριζόμενο άπορροφητήρα και εξατμίζεται το περιεχόμενο σε ρεύμα αέρος, μέχρι ξηρού. Αφήνονται να ψυχθούν μέχρι θερμοκρασίας περιβάλλοντος.

Προστίθενται 10,0 ml N,N-διμεθυλοφορμαμίδης (3.3) στο ποτήρι A και 2,0 ml αντίστοιχα στα ποτήρια B και C. Αφήνονται σε επαφή επί μερικά λεπτά, ανακινώντας ελαφρά, μέχρι πλήρους διαλύσεως του ιζήματος. Προστίθενται κατόπιν 8,0 ml αιθυλενοδιαμίνης (3.4) στα ποτήρια B και C και ομογενοποιούνται. Μετράται, πέντε λεπτά ακριβώς μετά την προσθήκη της αιθυλενοδιαμίνης, η οπτική πυκνότητα των τριών διαλυμάτων στο φασματοφωτόμετρο (4.6) στα 560 nm, χρησιμοποιώντας ως «τυφλό» τη N,N-διμεθυλοφορμαμίδα (3.3).

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε mg του dinitolmide ανά kg δείγματος δίδεται από τον τύπο:

$$\frac{(E_B - E_A)}{(E_C - E_B)} \cdot \frac{F}{P} \cdot 1\,000$$

όπου:

E_A = οπτική πυκνότητα του διαλύματος A (μάρτυρας).

E_B = οπτική πυκνότητα του διαλύματος B (δείγμα).

E_C = οπτική πυκνότητα του διαλύματος C (εσωτερικό πρότυπο).

P = βάρος εις g του δείγματος.

F = συντελεστής αραιώσεως (πραγματοποιούμενης ένδεχομένως στο 5.1).

7. Επαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των δύο παραλλήλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα, δεν πρέπει να υπερβεί:

τά 10 ppm, σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε dinitolmide κατώτερες των 100 ppm·

τό 10%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 100 και 5 000 ppm·

τά 500 ppm, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 5 000 και 10 000 ppm·

τό 5%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες ανώτερες των 10 000 ppm.

4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΙΚΑΡΒΑΖΙΝΗΣ

(ίσομοριακό μίγμα του 4,4-δινιτροκαρβανιλιδίου και της 2-ύδροξυ-4,6-διμεθυλοπυριμιδίνης)

1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της νικαρβαζίνης μέσα στις ζωοτροφές, τα συμπυκνώματα ζωοτροφών και τα προμείγματα τα οποία δεν περιέχουν περισσότερο από 5% αλεύρου χόρτων. Τα παράγωγα του νιτροφουρανίου, το acetylenheptine και το carbadox υπεισέρχονται στη μέτρηση. Το κατώτερο όριο του προσδιορισμού είναι 20 ppm.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με N,N-διμεθυλοφορμαμίδη. Το εκχύλισμα καθαρίζεται με χρωματογραφία σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Η νικαρβαζίνη εκλύεται με αιθανόλη. Το εκλούσμα κατεργάζεται με αλκοολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Αναπτύσσεται κίτρινη χρώση. Η νικαρβαζίνη προσδιορίζεται με φασματοφωτόμετρο στα 430 nm.

3. Αντιδραστήρια

3.1. N,N-διμεθυλοφορμαμίδη p.a.

3.2. Όξειδιο αργιλίου για χρωματογραφία σε στήλη. Πυρώνεται επί δύο ώρες τουλάχιστο στους 750 °C. Ψύχεται μέσα σε ξηραντήρα και διατηρείται σε φιάλη σκοτεινού χρώματος με έσφυρσιμο πώμα. Πριν από τη χρήση ελέγχεται η δραστηριότητα, υποβάλλοντας σε ανάλυση, από το σημείο 5.2, μία όρισμένη ποσότητα προτύπου διαλύματος (3.8.3). Το ποσοστό της ανακτήσεως της νικαρβαζίνης πρέπει να είναι $100\% \pm 2\%$.

3.3. Αιθανόλη 95% (όγκος/όγκο).

3.4. Αιθανόλη 80% (όγκος/όγκο).

3.5. Διάλυμα 50% (βάρος/όγκο) υδροξειδίου του νατρίου p.a.

3.6. Αιθανολικό διάλυμα 1% (βάρος/όγκο) υδροξειδίου του νατρίου: φέρεται 1 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.5) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη των 50 ml και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 80% (3.4). Παρασκευάζεται άμεσα πριν από τη χρήση.

3.7. Ουσία για παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων: νικαρβαζίνη καθαρή, συντελεστής μοριακής αποσθέσεως στα 362 nm στη N,N-διμεθυλοφορμαμίδη $37,8 \times 10^3$.

3.8. Πρότυπα διαλύματα:

3.8.1. Διάλυμα 1,25 mg νικαρβαζίνης ανά ml: ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 125 mg της ουσίας (3.7). Διαλύονται με 75 ml N,N-διμεθυλοφορμαμίδης (3.1) σε μία όγκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml θερμαίνοντας ελαφρά. Αφήνεται να ψυχθεί, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και όμογενοποιείται. Διατηρείται μακριά από το φως.

3.8.2. Διάλυμα 0,125 mg νικαρβαζίνης ανά ml: λαμβάνονται 10,0 ml διαλύματος (3.8.1), συμπληρώνονται στα 100 ml με N,N-διμεθυλοφορμαμίδη (3.1) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη και όμογενοποιούνται.

3.8.3. Διάλυμα 0,025 mg νικαρβαζίνης ανά ml: λαμβάνονται 20,0 ml διαλύματος (3.8.2), συμπληρώνονται στα 100 ml με N,N-διμεθυλοφορμαμίδη (3.1) μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη και όμογενοποιούνται.

4. Συσκευές

4.1. Κωνική φιάλη των 250 ml, με έσφυρσιμο στόμιο.

4.2. Κάθετος ψυκτήρας, με έσφυρσιμο στόμιο.

4.3. Ύδρόλουτρο.

4.4. Φυγόκεντρος με σωλήνες των 120 ml.

4.5. Υάλινος σωλήνας για χρωματογραφία (έσωτερικής διαμέτρου: 25 mm, μήκος: 300 mm).

4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες των 10 mm.

4.7. Προχοΐδα βαθμολογημένη ανά 1/10 ml.

5. Τρόπος εργασίας

5.1. Έκχύλιση

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 1 mg, 10 g του δείγματος λεπτά διαμερισμένου και όμογενοποιημένου. Για τα συμπυκνώματα ζωοτροφών και για τα προμείγματα, ζυγίζεται 1 g, με ακρίβεια 1 mg. Εισάγεται το δείγμα σε κωνική φιάλη των 250 ml (4.1) και προστίθενται ακριβώς 100 ml N,N-διμεθυλοφορμαμίδης (3.1). Αναμιγνύονται, εφοδιάζεται ή φιάλη με έναν κάθετο ψυκτήρα (4.2) και θερμαίνεται σε ζέον υδρόλουτρο (4.3) επί 15 λεπτά, ανακινώντας από καιρού σε καιρό. Αφήνεται να ψυχθεί σε ρεύμα ψυχρού ύδατος. Μεταγγίζεται κατόπιν το υγρό το οποίο επιπλέει μέσα σε φυγοκεντρικό σωλήνα (4.4) και φυγοκεντρείται επί 3 λεπτά περίπου. Αν είναι αναγκαίο λαμβάνονται 25,0 ml από το υγρό το οποίο επιπλέει και αραιώνονται με N,N-διμεθυλοφορμαμίδη (3.1) ώστε να ληφθεί διάλυμα περιέχον 2,0 ως 10,0 mg νικαρβαζίνης ανά ml.

5.2. Χρωματογραφία

Εισάγονται σε σωλήνα χρωματογραφίας (4.5) 30 g άργιλιού (3.2) εν αιωρήσει μέσα σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδη (3.1). Αφήνεται να κατέλθει το υγρό μέχρι ύψους 1 cm υπέρνω της στήλης του όξειδίου του άργιλιού και εισάγονται κατόπιν στη στήλη 25,0 ml από το εκχύλισμα, το οποίο ελήφθη στην 5.1. Αφήνεται να ρέυσει το υγρό φροντίζοντας ώστε να μη μείνει ή στήλη χωρίς υγρό και εκπλύνεται αυτή τρεις φορές με 10 ml N,N-διμεθυλοφορμαμίδης (3.1) κάθε φορά. Έκλούεται κατόπιν με το 70 ml αιθανόλης 95% (3.3). Απορρίπτονται τα 10 πρώτα ml του εκλούσματος και παραλαμβάνεται το υπόλοιπο κλασματικά ως ακολούθως:

ένα κλάσμα (α) των 5 ml.

ένα κλάσμα (β) των 50 ml μέσα σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη.

ένα κλάσμα (γ) των 5 ml.

Ελέγχεται ώστε τα κλάσματα (α) και (γ) να μη δίδουν κίτρινη χρώση με προσθήκη αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6). Συνεχίζεται η εργασία στο κλάσμα (β) όπως καθορίζεται στην (5.3).

5.3. Ανάπτυξη του χρώματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

Εισάγονται αντίστοιχως 20,0 ml του κλάσματος (β) του εκλούσματος μέσα σε δύο όγκομετρικές σφαιρικές φιάλες Α και Β των 25 ml. Προστίθενται στη σφαιρική φιάλη Α 5,0 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6) και στη σφαιρική φιάλη Β 5,0 ml αιθανόλης 95% (3.3). Όμογενοποιούνται.

Μετράται, στά 5 λεπτά που ακολουθούν, η οπτική πυκνότητα των δύο διαλυμάτων στά 430 nm, χρησιμοποιώντας σαν «τυφή» μέτρηση ένα μίγμα 20,0 ml αιθανόλης 95% (3.3) και 5,0 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6).

Αφαιρείται η τιμή της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος Β από εκείνη του διαλύματος Α. Προσδιορίζεται βάσει αυτής της τιμής, ή ποσότητα της νικαρβαζίνης ανατρέχοντας στην καμπύλη αναφοράς (5.4).

5.4. Καμπύλη αναφοράς

25,0 ml προτύπου διαλύματος (3.8.3) υποβάλλονται σε χρωματογραφία όπως υποδεικνύεται στην 5.2. Μεταγγίζεται στην προχοΐδα το κλάσμα (β) του εκλούσματος και αφήνονται να ρέυσουν στις όγκομετρικές σφαιρικές φιάλες των 25 ml αντίστοιχως 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 και 10,0 ml που αντιστοιχούν σε 0,025 - 0,050 - 0,075 - 0,100 και 0,125 mg (νικαρβαζίνης). Προστίθενται μέσα σε κάθε σφαιρική φιάλη 5,0 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη 95% (3.3) και όμογενοποιούνται.

Μετράται στά 5 λεπτά που ακολουθούν η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων στά 430 nm, χρησιμοποιώντας σαν «τυφή» μέτρηση ένα μίγμα 20,0 ml αιθανόλης 95% (3.3) και 5,0 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.6)

Χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς σημειώνοντας στον άξονα των τεταγμένων τις τιμές της οπτικής πυκνότητας και στον άξονα των τετμημένων τις αντίστοιχες ποσότητες της νικαρβαζίνης σε mg.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε mg της νικαρβαζίνης ανά kg δείγματος δίδεται από τον τύπο:

$$\frac{A}{P} \cdot F \cdot 10\,000$$

όπου:

A = ποσότης της νικαρβαζίνης σε mg προσδιοριζομένης φωτομετρικώς·

P = βάρος σε g του δείγματος

F = συντελεστής αραίωσης (πραγματοποιηθείσα ένδεχομένως στην 5.1).

7. Έπαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παραλλήλων μετρήσεων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν επί του ίδιου μίγματος δεν πρέπει να υπερβαίνουν:

τά 10 ppm, σε απόλυτο τιμή, για περιεκτικότητες σε νικαρθαζίνη κατώτερες των 100 ppm

τό 10%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 100 και 5 000 ppm

τά 500 ppm, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 5 000 και 10 000 ppm

τό 5%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες ανώτερες των 10 000 ppm.

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΝΑΔΙΟΝΕ (ΒΙΤΑΜΙΝΗ K₃)

1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της μέναδιονε (βιταμίνη K₃) μέσα στις ζωοτροφές, στα συμπυκνώματα ζωοτροφών και στα προμίγματα. Το κατώτερο όριο του προσδιορισμού είναι 1 ppm.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με άραιη αιθανόλη. Το μίγμα καθαρίζεται με διάλυμα ταννίνης και φυγοκεντρείται. Το εκχύλισμα κατεργάζεται με διάλυμα άνθρακικού νατρίου. Η απελευθερωμένη μέναδιονε παραλαμβάνεται με 1,2-διχλωροαιθάνιο. Το διχλωροαιθανικό εκχύλισμα κατεργάζεται ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε μέναδιονε είτε απ' ευθείας, είτε κατόπιν εξατμίσεως με αιθανολικό διάλυμα 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης όξισμένο με υδροχλωρικό όξύ. Η λαμβανομένη υδραζόνη κατόπιν προσθήκης περίσσειας άμμωνίας δίδει σύμπλοκο κυανοπράσινο, του οποίου η όπτική πυκνότητα μετράται στα 635 nm.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Αιθανόλη 96% (όγκος/όγκο).
- 3.2. Αιθανόλη (3.1) αραιωμένη στα 40% με ύδωρ.
- 3.3. Διάλυμα 10% (βάρος/όγκο) ταννίνης, από καθαρή ταννίνη σε σκόνη.
- 3.4. 1,2-διχλωροαιθάνιο p.a.
- 3.5. Διάλυμα 10% (βάρος/όγκο) ανύδρου άνθρακικού νατρίου p.a.
- 3.6. Υδροχλωρικό όξύ 37% (βάρος/όγκο), d=1,19.
- 3.7. Απόλυτος αιθανόλη p.a.
- 3.8. Αντιδραστήριο 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης: Διαλύονται 40 mg 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης p.a. σε 40 ml περίπου απόλυτου αιθανόλης σε βρασμό (3.7), αφήνεται να ψυχθεί και μεταγγίζεται σε όγκομετρική σφαιρική φιάλη των 50 ml. Προστίθεται 1 ml υδροχλωρικού όξέος (3.6) και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με απόλυτο αιθανόλη (3.7). Παρασκευάζεται άμέσως πριν από τη χρήση.
- 3.9. Άμμωνία 25% (βάρος/όγκο), d=0,91.
- 3.10. Άμμωνιακό διάλυμα αιθανόλης. Αναμιγνύεται ένας όγκος αιθανόλης (3.7) με έναν όγκο άμμωνίας (3.9).
- 3.11. Πρότυπα διαλύματα μέναδιονε: Διαλύονται 20 mg μέναδιονε (βιταμίνη K₃) μέσα σε 1,2-διχλωροαιθάνιο (3.4) και συμπληρώνονται μέχρι τα 200 ml. Αραιώνονται κατάλληλες ποσότητες του διαλύματος αυτού με 1,2-διχλωροαιθάνιο (3.4) ώστε να ληφθεί σειρά διαλυμάτων των οποίων οι συγκεντρώσεις σε μέναδιονε είναι μεταξύ 2 και 10 mg ανά ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να είναι πρόσφατα.

4. Συσκευές

- 4.1. Μηχανικός αναδευτήρας.
- 4.2. Φυγόκεντρος (3 000 ως 5 000 στρ/λεπτό).
- 4.3. Διαχωριστικές χοάνες των 100 και 250 ml με έσφυρισμένο πώμα.
- 4.4. Συσκευή εξατμίσεως υπό κενό, με περιστρεφόμενη φιάλη, με σφαιρικές φιάλες των 250 ml.
- 4.5. Υδρόλουτρο.
- 4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες πάχους 10 mm.

5. Τρόπος εργασίας

Σημείωση: Όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται σε χώρο ο οποίος προστατεύεται από τον απ' ευθείας φωτισμό, ένδεχομένως σε συσκευή από φαιά ύαλο.

5.1. Δειγματοληψία

Λαμβάνεται δείγμα, λεπτά διαμερισμένο, ανάλογο της υποτιθεμένης περιεκτικότητας σε μέναδιονε ήτοι: 0,1 ως 5,0 g για τα συμπυκνώματα και προμίγματα, 20-30 g για τις ζωοτροφές. Εισάγεται άμέσως το δείγμα στη φιάλη των 250 ml με το έσφυρισμένο πώμα.

5.2. Έκχυλιση

Προστίθενται 96 ml άκριβώς διαλύματος αϊθανόλης (3.2) και άναδεύονται μηχανικά επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Προστίθενται κατόπιν 4,0 ml διαλύματος ταννίνης (3.3), άναμιγνύονται, μεταγγίζεται τό εκχύλισμα μέσα σε φυγοκεντρικό σωλήνα, φυγοκεντρείται (3 000-5 000 στρ./λεπτό) και άφήνεται νά καθιζάνει.

Εισάγονται 20-40 ml εκχυλίσματος, άκριβώς μετρηθέντα, μέσα σε διαχωριστική χοάνη τών 250 ml προστίθενται με τό σιφώνιο 50 ml 1,2-διχλωροαιθανίου (3.4), άναμιγνύονται και προστίθενται με σιφώνιο 20 ml, διαλύματος άνθρακικού νατρίου (3.5). Άναδεύεται ίσχυρά επί 30 δευτερόλεπτα και παραλαμβάνεται κατόπιν ή στιβάδα του διχλωροαιθανίου μέσα σε διαχωριστική χοάνη τών 100 ml. Προστίθενται 20 ml ύδατος, άναδεύονται επί 15 δευτερόλεπτα άκόμη, παραλαμβάνεται στιβάδα του διχλωροαιθανίου και άπομακρύνονται τά ίχνη του ύδατος με τή βοήθεια λωρίδων διηθητικού χάρτου.

Γιά τά συμπυκνώματα και προμίγματα λαμβάνεται ένα μέρος του εκχυλίσματος και άραιώνεται με 1,2-διχλωροαιθάνιο (3.4) ώστε νά ληφθεί μία συγκέντρωση σε μένadiione 2-10 mg ανά ml. Γιά τίς ζωτροφές, εξατμίζεται μέχρι ξηρού ένα μέρος του εκχυλίσματος υπό έλαττωμένη πίεση και σε άτμόσφαιρα άζώτου, σε ύδρόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C. Λαμβάνεται πάλι ταχέως τό υπόλειμμα με 1,2 διχλωροαιθάνιο (3.4) ώστε νά ληφθεί διάλυμα περιέχον 2 ως 10 mg μένadiione ανά ml.

5.3. Σχηματισμός ύδραζόνης

Φέρονται 2 ml εκχυλίσματος του διχλωροαιθανίου τό όποιο έλήφθη στό 5.2 σε μία όγκομετρική φιάλη τών 10 ml και προστίθενται 3,0 ml άντιδραστήριου τής 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (3.8), πωματίζεται ή σφαιρική φιάλη με πώμα από φελλό ή teflon έτσι ώστε νά άποφευχθεί οιαδήποτε εξάτμιση και θερμαίνεται επί 2 ώρες σε ύδρόλουτρο. Άφήνεται νά ψυχθεί, προστίθενται 3,0 ml άμμωνιακού διαλύματος αϊθανόλης (3.10), άναμιγνύονται, συμπληρώνεται ό όγκος με άπόλυτο αϊθανόλη (3.7) και άναμιγνύεται εκ νέου.

5.4. Μέτρηση τής όπτικής πυκνότητας

Μετράται ή όπτική πυκνότητα του κυανοπρασίνου συμπλόκου στο φασματοφωτόμετρο στα 635 nm, διά συγκρίσεως με ένα «τυφλό» πείραμα του άντιδραστήριου, που έλήφθη διά κατεργασίας 2,0 ml 1,2-διχλωροαιθανίου (3.4) όπως ύποδεικνύεται στην 5.3. Προσδιορίζεται ή ποσότητα τής μένadiione άνατρέχοντας στην καμπύλη άναφοράς, ή όποία χαράχθηκε για κάθε σειρά άναλύσεων.

5.5. Καμπύλη άναφοράς

2,0 ml προτύπων διαλυμάτων μένadiione (3.11) κατεργάζονται όπως ύποδεικνύεται στην 5.3. Μετράται ή όπτική πυκνότητα όπως ύποδεικνύεται στην 5.4. Χαράσσεται ή καμπύλη άναφοράς σημειώνοντας στον άξονα τών τεταγμένων τίς τιμές τής όπτικής πυκνότητας και στον άξονα τών τετημένων τίς άντίστοιχες ποσότητες τής μένadiione, σε mg.

6. Ύπολογισμός τών άποτελεσμάτων

Ύπολογίζεται ή περιεκτικότητα σε μένadiione του δείγματος λαμβάνοντας ύπόψη τό βάρος του δείγματος και τίς άραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τή διάρκεια τής άναλύσεως. Τό άποτέλεσμα εκφράζεται σε mg μένadiione ανά kg.

7. Έπαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ τών άποτελεσμάτων δύο παραλλήλων προσδιορισμών, πραγματοποιηθέντων επί του ίδιου δείγματος, δέν πρέπει νά ύπερβαίνει:

τό 20%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες σε μένadiione κατώτερες τών 10 ppm.

τά 2 ppm, σε άπόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 10 και 14 ppm,

τό 15%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 14 και 100 ppm,

τά 15 ppm, σε άπόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 100-150 ppm,

τό 10%, σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες άνώτερες τών 150 ppm.