

Το κείμενο αυτό αποτελεί απλώς εργαλείο τεκμηρίωσης και δεν έχει καμία νομική ισχύ. Τα θεσμικά όργανα της Ένωσης δεν φέρουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του. Τα αυθεντικά κείμενα των σχετικών πράξεων, συμπεριλαμβανομένων των προοιμίων τους, είναι εκείνα που δημοσιεύονται στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης και είναι διαθέσιμα στο EUR-Lex. Αυτά τα επίσημα κείμενα είναι άμεσα προσβάσιμα μέσω των συνδέσμων που περιέχονται στο παρόν έγγραφο

► **B****ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 152/2009 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 27ης Ιανουαρίου 2009

για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(ΕΕ L 54 της 26.2.2009, σ. 1)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
► <u>M1</u>	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 278/2012 της Επιτροπής της 28ης Μαρτίου 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 51/2013 της Επιτροπής της 16ης Ιανουαρίου 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 691/2013 της Επιτροπής της 19ης Ιουλίου 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 709/2014 της Επιτροπής της 20ής Ιουνίου 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Κανονισμός (ΕΕ) 2017/645 της Επιτροπής της 5ης Απριλίου 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Κανονισμός (ΕΕ) 2017/771 της Επιτροπής της 3ης Μαΐου 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2020/1560 της Επιτροπής της 26ης Οκτωβρίου 2020	L 357	17	27.10.2020

▼ B

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 152/2009 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 27ης Ιανουαρίου 2009

για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον
επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

▼ M3*Άρθρο 1*

Η δειγματοληψία για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών, ειδικότερα όσον αφορά τον προσδιορισμό των συστατικών, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα υλικά που περιέχουν γενετικώς τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ) ή αποτελούνται ή παράγονται από ΓΤΟ, οι πρόσθετες ύλες ζωοτροφών, όπως ορίζονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽¹⁾, και οι ανεπιθύμητες ουσίες, όπως ορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽²⁾, διενεργείται σύμφωνα με τις μεθόδους που παρατίθενται στο παράρτημα Ι.

Οι μέθοδοι δειγματοληψίας που παρατίθενται στο παράρτημα Ι ισχύουν για τον έλεγχο των ζωοτροφών όσον αφορά τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων (καταλοίπων) φυτοφαρμάκων, όπως ορίζονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽³⁾, καθώς και για τον έλεγχο της συμμόρφωσης με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 619/2011.

▼ B*Άρθρο 2*

Η προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση και η έκφραση των αποτελεσμάτων διενεργούνται σύμφωνα με τις μεθόδους που καθορίζονται στο παράρτημα ΙΙ.

Άρθρο 3

Η ανάλυση για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών διενεργείται εφαρμόζοντας τις μεθόδους που αναφέρονται στο παράρτημα ΙΙΙ (Μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο της σύστασης των πρώτων υλών ζωοτροφών και των σύνθετων ζωοτροφών), στο παράρτημα ΙV (Μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο της περιεκτικότητας ζωοτροφών σε εγκεκριμένες πρόσθετες ύλες), στο παράρτημα V (Μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων ουσιών στις ζωοτροφές) και στο παράρτημα VI (Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό των συστατικών ζωικής προέλευσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών).

Άρθρο 4

Η ενεργειακή αξία των σύνθετων ζωοτροφών για πουλερικά υπολογίζεται σύμφωνα με το παράρτημα VII.

Άρθρο 5

Οι μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο της παράνομης περιεκτικότητας ζωοτροφών σε μη εγκεκριμένες πλέον πρόσθετες ύλες οι οποίες περιέχονται στο παράρτημα VIII χρησιμοποιούνται για λόγους επιβεβαίωσης.

⁽¹⁾ ΕΕ L 268 της 18.10.2003, σ. 29.

⁽²⁾ ΕΕ L 140 της 30.5.2002, σ. 10.

⁽³⁾ ΕΕ L 70 της 16.3.2005, σ. 1..

▼B*Άρθρο 6*

Οι οδηγίες 71/250/ΕΟΚ, 71/393/ΕΟΚ, 72/199/ΕΟΚ, 73/46/ΕΟΚ, 76/371/ΕΟΚ, 76/372/ΕΟΚ, 78/633/ΕΟΚ, 81/715/ΕΟΚ, 84/425/ΕΟΚ, 86/174/ΕΟΚ, 93/70/ΕΟΚ, 93/117/ΕΚ, 98/64/ΕΚ, 1999/27/ΕΚ, 1999/76/ΕΚ, 2000/45/ΕΚ, 2002/70/ΕΚ και 2003/126/ΕΚ καταργούνται.

Οι αναφορές στις καταργούμενες οδηγίες νοούνται ως αναφορές στην παρούσα οδηγία και διαβάζονται σύμφωνα με τους πίνακες αντιστοιχίας του παραρτήματος ΙΧ.

Άρθρο 7

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Εφαρμόζεται από τις 26 Αυγούστου 2009.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

▼ M3

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Τα δείγματα που προορίζονται για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών λαμβάνονται σύμφωνα με τις μεθόδους οι οποίες περιγράφονται κατωτέρω. Τα δείγματα που λαμβάνονται με τον τρόπο αυτό θεωρούνται αντιπροσωπευτικά των δειγματοζόμενων τμημάτων.

Σκοπός της αντιπροσωπευτικής δειγματοληψίας είναι η λήψη μικρού κλάσματος παρτίδας, έτσι ώστε ο προσδιορισμός οποιουδήποτε ιδιαίτερου χαρακτηριστικού αυτού του κλάσματος να αντιστοιχεί στη μέση τιμή του χαρακτηριστικού της παρτίδας. Η παρτίδα δειγματίζεται με την επαναληπτική λήψη μερικών ποσοτήτων δείγματος σε διάφορες μεμονωμένες θέσεις της. Οι εν λόγω μερικές ποσότητες δείγματος συνδυάζονται με ανάμειξη για να σχηματιστεί ένα συνολικό δείγμα, από το οποίο παρασκευάζονται αντιπροσωπευτικά τελικά δείγματα με αντιπροσωπευτική διαίρεση.

Εάν διαπιστωθεί με οπτική εξέταση ότι τα προς δειγματοληψία τμήματα της ζωοτροφής διαφέρουν ως προς την ποιότητα από την υπόλοιπη ζωοτροφή της ίδιας παρτίδας, τα εν λόγω τμήματα διαχωρίζονται από την υπόλοιπη ζωοτροφή και αντιμετωπίζονται ως χωριστή υποπαρτίδα. Εάν η διαίρεση της ζωοτροφής σε χωριστές υποπαρτίδες είναι αδύνατη, η ζωοτροφή δειγματίζεται ως μία παρτίδα και το γεγονός αυτό αναφέρεται στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

Όταν διαπιστώνεται ότι ζωοτροφή, από την οποία ελήφθησαν δείγματα σύμφωνα με τις διατάξεις του παρόντος κανονισμού, δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις και η εν λόγω ζωοτροφή αποτελεί μέρος παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής, θεωρείται ότι η διαπίστωση αφορά το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

2. ΟΡΙΣΜΟΙ

- Παρτίδα: προσδιορισμένη ποσότητα ζωοτροφών που έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως καταγωγή, ποικιλία, είδος συσκευασίας, συσκευαστή, αποστολέα ή επισήμανση και, όταν πρόκειται για διεργασία παραγωγής, μια μονάδα παραγωγής προερχόμενη από μία μόνο εγκατάσταση παραγωγής, στην οποία χρησιμοποιούνται ενιαίες παράμετροι παραγωγής, ή ένας ορισμένος αριθμός τέτοιων μονάδων, όταν παράγονται σε συνεχή σειρά και αποθηκεύονται μαζί.
- Δειγματοζόμενο τμήμα: παρτίδα ή προσδιορισμένο μέρος της παρτίδας ή υποπαρτίδας.
- Σφραγισμένο δείγμα: δείγμα το οποίο σφραγίζεται κατά τρόπο που εμποδίζει την πρόσβαση στο δείγμα χωρίς θραύση ή αφαίρεση της σφραγίδας.
- Μερική ποσότητα (δόση) δείγματος: ποσότητα λαμβανόμενη από ένα σημείο του δειγματοζόμενου τμήματος.
- Συνολικό δείγμα: άθροισμα των μερικών ποσοτήτων δείγματος που έχουν ληφθεί από το ίδιο δειγματοζόμενο τμήμα.
- Μειωμένο δείγμα: μέρος του συνολικού δείγματος, το οποίο προκύπτει από αυτό με διαδικασία αντιπροσωπευτικής μείωσης.
- Τελικό δείγμα: μέρος του μειωμένου δείγματος ή του ομογενοποιημένου συνολικού δείγματος.
- Εργαστηριακό δείγμα: δείγμα που προορίζεται για το εργαστήριο (όπως παραλαμβάνεται από το εργαστήριο) και μπορεί να είναι τελικό, μειωμένο ή συνολικό δείγμα.

▼ M3

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

- Δειγματοληπτικό προσωπικό: τα δείγματα λαμβάνονται από πρόσωπα εξουσιοδοτημένα για τον σκοπό αυτό από την αρμόδια αρχή.
- Τα δείγματα πρέπει να σφραγίζονται κατά τρόπο που εμποδίζει την πρόσβαση στο δείγμα χωρίς θραύση ή αφαίρεση της σφραγίδας. Το σήμα της σφραγίδας θα πρέπει να είναι αναγνωρίσιμο με βεβαιότητα και ευδιάκριτο. Εναλλακτικά, επιτρέπεται η τοποθέτηση του δείγματος σε περιέκτη που να μπορεί να πωματιστεί κατά τρόπο ώστε να μην είναι δυνατόν να ανοιχθεί χωρίς ανεπανόρθωτη βλάβη του περιέκτη, ο οποίος δεν πρέπει να επαναχρησιμοποιείται.
- Ταυτοποίηση του δείγματος: το δείγμα πρέπει να φέρει ανεξίτηλη σήμανση και να ταυτοποιείται κατά τρόπο που να το συνδέει σαφώς με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας.
- Από κάθε συνολικό δείγμα λαμβάνονται τουλάχιστον δύο τελικά δείγματα: τουλάχιστον ένα για τον έλεγχο (επιβολή της νομοθεσίας) και ένα για την επιχείρηση ζωοτροφών (μέσο άμυνας). Είναι δυνατόν να ληφθεί ένα τελικό δείγμα ως δείγμα αναφοράς. Σε περίπτωση ομογενοποίησης του πλήρους συνολικού δείγματος, τα τελικά δείγματα λαμβάνονται από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα, εκτός εάν η διαδικασία αυτή αντίκειται στους κανόνες των κρατών μελών για τα δικαιώματα των επιχειρήσεων ζωοτροφών.

4. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- 4.1. Ο εξοπλισμός δειγματοληψίας πρέπει να είναι κατασκευασμένος από υλικά που δεν είναι δυνατόν να μολύνουν τα προς δειγματοληψία προϊόντα. Ο εξοπλισμός πολλαπλών χρήσεων πρέπει να μπορεί να καθαρίζεται εύκολα ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη μόλυνση.

4.2. Συνιστώμενος εξοπλισμός για τη δειγματοληψία στερεών ζωοτροφών

4.2.1. Μη μηχανική δειγματοληψία

4.2.1.1. Φτυάρι με επίπεδο πυθμένα και κατακόρυφες πλευρές

- 4.2.1.2. Δειγματολήπτης τύπου λόγχης με επιμήκη σχισμή ή με διαμερίσματα. Οι διαστάσεις του δειγματολήπτη τύπου λόγχης πρέπει να είναι κατάλληλες για τα χαρακτηριστικά του δειγματιζόμενου τμήματος (βάθος περιέκτη, διαστάσεις σάκου κ.λπ.) και το μέγεθος σωματιδίων της ζωοτροφής.

Εάν ο δειγματολήπτης τύπου λόγχης διαθέτει πολλά ανοίγματα, αυτά θα πρέπει να χωρίζονται μεταξύ τους με διαμερίσματα ή να είναι διαγωνίως στοιχισμένα (ζιγκ ζαγκ), ώστε να εξασφαλίζεται η λήψη των δειγμάτων στις διάφορες θέσεις κατά μήκος του δειγματολήπτη.

4.2.2. Μηχανική δειγματοληψία

Για τη δειγματοληψία ρευστών ζωοτροφών επιτρέπεται να χρησιμοποιείται κατάλληλος μηχανικός εξοπλισμός. Ο όρος «κατάλληλος» σημαίνει ότι λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον από ολόκληρη τη διατομή που καταλαμβάνει η ροή.

Η δειγματοληψία ρευστών ζωοτροφών (με υψηλές ταχύτητες ροής) μπορεί να διενεργηθεί με αυτόματους δειγματολήπτες.

4.2.3. Διαρέτης

Για την παρασκευή μειωμένων δειγμάτων με αντιπροσωπευτικό τρόπο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται, κατά το δυνατόν και εφόσον κρίνεται σκόπιμο, συσκευές που προορίζονται για τη διαίρεση του δείγματος σε ίσα περίπου μέρη.

▼ M3

5. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Οι ποσοτικές απαιτήσεις των σημείων 5.1 και 5.2, όσον αφορά τον αριθμό των μερικών ποσοτήτων δείγματος, ισχύουν για δειγματιζόμενα τμήματα που δεν υπερβαίνουν τους 500 τόνους και από τα οποία μπορούν να ληφθούν δείγματα με αντιπροσωπευτικό τρόπο. Η περιγραφόμενη διαδικασία δειγματοληψίας ισχύει και για ποσότητες μεγαλύτερες από το καθοριζόμενο μέγιστο μέγεθος δειγματιζόμενου τμήματος υπό τον όρο ότι αγνοείται ο μέγιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος που παρατίθεται στους κατωτέρω πίνακες και ότι ο αριθμός των μερικών ποσοτήτων δείγματος προσδιορίζεται από τον τύπο εξαγωγής τετραγωνικής ρίζας που περιλαμβάνεται στο αντίστοιχο τμήμα της διαδικασίας (βλέπε σημείο 5.3), ενώ αυξάνεται αναλόγως το ελάχιστο μέγεθος συνολικού δείγματος. Αυτό δεν αποκλείει τη διαίρεση μεγάλων παρτίδων σε μικρότερες υποπαρτίδες και τη δειγματοληψία από κάθε υποπαρτίδα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα σημεία 5.1 και 5.2.
- Το μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος πρέπει να καθιστά εφικτή τη δειγματοληψία από όλα τα μέρη που το αποτελούν.
- Για πολύ μεγάλες παρτίδες ή υποπαρτίδες (άνω των 500 τόνων) και για παρτίδες οι οποίες μεταφέρονται ή αποθηκεύονται με τρόπο που δεν επιτρέπει τη δειγματοληψία με τη διαδικασία δειγματοληψίας που προβλέπεται στα σημεία 5.1 και 5.2 του παρόντος κεφαλαίου, πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 5.3.
- Εάν η νομοθεσία επιβάλλει στη επιχείρηση ζωοτροφών υποχρέωση συμμόρφωσης με τον παρόντα κανονισμό στο πλαίσιο υποχρεωτικού συστήματος παρακολούθησης, η επιχείρηση ζωοτροφών μπορεί να αποκλίνει από τις ποσοτικές απαιτήσεις του παρόντος κεφαλαίου, προκειμένου να λάβει υπόψη επιχειρησιακά χαρακτηριστικά, υπό τον όρο ότι έχει αποδείξει κατά τρόπο που ικανοποιεί την αρμόδια αρχή την ισοδυναμία της διαδικασίας δειγματοληψίας από πλευράς αντιπροσωπευτικότητας και έχει λάβει σχετική άδεια από την αρμόδια αρχή.
- Σε έκτακτες περιπτώσεις, εάν δεν είναι δυνατή η εφαρμογή της καθοριζόμενης μεθόδου δειγματοληψίας ως προς τις ποσοτικές απαιτήσεις, επειδή προκαλείται εμπορικά απαράδεκτη ζημία στην παρτίδα (λόγω της μορφής της συσκευασίας, του μέσου μεταφοράς, του τρόπου αποθήκευσης κ.λπ.), επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικής μεθόδου δειγματοληψίας, υπό τον όρο ότι είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη και ότι περιγράφεται και τεκμηριώνεται πλήρως.

5.1. Ποσοτικές απαιτήσεις σχετικά με τις μερικές ποσότητες δείγματος για τον έλεγχο ουσιών ή προϊόντων που είναι ομοιογενώς κατανεμημένα σε ολόκληρη τη ζωοτροφή

5.1.1. Ασυσκέυαστες (χύμα) στερεές ζωοτροφές

Μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος	Ελάχιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος (δόσεων)
≤ 2,5 τόνοι	7
> 2,5 τόνοι	$\sqrt{\text{γινόμενο του αριθμού των τόνων που αποτελούν το δειγματιζόμενο τμήμα επί 20 (*)}}$, με ανώτατο όριο τις 40 μερικές ποσότητες δείγματος

(*) Όταν ο αριθμός που προκύπτει είναι κλασματικός, στρογγυλοποιείται προς τα άνω στον πλησιέστερο ακέραιο.

▼ M3

5.1.2. *Ασυσκεύαστες υγρές ζωοτροφές*

Μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος	Ελάχιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος (δόσεων)
≤ 2,5 τόνοι ή ≤ 2 500 λίτρα	4 (*)
> 2,5 τόνοι ή > 2 500 λίτρα	7 (*)

(*) Εάν δεν είναι δυνατόν να ομογενοποιηθεί το υγρό, πρέπει να αυξάνεται ο αριθμός των μερικών ποσοτήτων δείγματος.

5.1.3. *Συσκευασμένες ζωοτροφές*

Οι ζωοτροφές (στερεές και υγρές) μπορούν να συσκευαστούν σε σάκους, μεταλλικά κουτιά, βαρέλια κ.λπ., που αναφέρονται στον πίνακα ως μονάδες. Η δειγματοληψία από μεγάλες μονάδες (≥ 500 kg ή λίτρα) πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις διατάξεις που αφορούν τις ασυσκεύαστες ζωοτροφές (βλέπε σημεία 5.1.1 και 5.1.2).

Μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος	Ελάχιστος αριθμός μονάδων από τις οποίες πρέπει να λαμβάνεται μία (τουλάχιστον) μερική ποσότητα δείγματος (*)
1 έως 20 μονάδες	1 μονάδα (**)
21 έως 150 μονάδες	3 μονάδες (**)
151 έως 400 μονάδες	5 μονάδες (**)
> 400 μονάδες	¼ της √ αριθμός των μονάδων που αποτελούν το δειγματιζόμενο τμήμα (***), με ανώτατο όριο τις 40 μονάδες

(*) Εάν το άνοιγμα μιας μονάδας ενδέχεται να επηρεάσει την ανάλυση (π.χ. ευαλλοίωτες υγρές ζωοτροφές), μερική ποσότητα δείγματος είναι η άθικτη μονάδα.

(**) Στην περίπτωση των μονάδων με περιεχόμενο που δεν υπερβαίνει το 1 kg ή το 1 λίτρο, μερική ποσότητα δείγματος είναι το περιεχόμενο μιας αρχικής μονάδας.

(***) Όταν ο αριθμός που προκύπτει είναι κλασματικός, στρογγυλοποιείται προς τα άνω στον πλησιέστερο ακέραιο.

5.1.4. *Κτηνοτροφικές πλάκες και πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων*

Τουλάχιστον μία κτηνοτροφική πλάκα ή πλάκα λείξης ανά δειγματιζόμενο τμήμα 25 μονάδων, με ανώτατο όριο τις 4 πλάκες.

Στην περίπτωση των κτηνοτροφικών πλακών ή πλακών λείξης των οποίων το βάρος δεν υπερβαίνει το 1 kg, μερική ποσότητα δείγματος είναι το περιεχόμενο μιας πλάκας.

5.1.5. *Χορτονομή*

Μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος	Ελάχιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος (δόσεων) (*)
≤ 5 τόνοι	5
> 5 τόνοι	√ γινόμενο του αριθμού των τόνων που αποτελούν το δειγματιζόμενο τμήμα επί 5 (**), με ανώτατο όριο τις 40 μερικές ποσότητες δείγματος

(*) Αναγνωρίζεται ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. ενσιρωμένες ζωοτροφές), δεν είναι δυνατόν να ληφθούν οι απαιτούμενες μερικές ποσότητες δείγματος χωρίς να προκληθεί απαράδεκτη ζημία στην παρτίδα. Στις περιπτώσεις αυτές επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικής μεθόδου δειγματοληψίας. Καθοδήγηση για τη δειγματοληψία παρτίδων αυτού του είδους θα εκπονηθεί πριν από την έναρξη της εφαρμογής του παρόντος κανονισμού.

(**) Όταν ο αριθμός που προκύπτει είναι κλασματικός, στρογγυλοποιείται προς τα άνω στον πλησιέστερο ακέραιο.

▼ M3

5.2. Ποσοτικές απαιτήσεις σχετικά με τις μερικές ποσότητες δείγματος για τον έλεγχο συστατικών ή ουσιών που ενδέχεται να είναι ανομοιογενώς καταναμημένα στη ζωοτροφή

Αυτές οι ποσοτικές απαιτήσεις, όσον αφορά τις μερικές ποσότητες δείγματος, πρέπει να τηρούνται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

— έλεγχος αφλατοξινών, εργοτίου της σίκαλης, άλλων μυκοτοξινών και επιβλαβών βοτανικών προσμείξεων των πρώτων υλών ζωοτροφών·

— έλεγχος της διασταυρούμενης μόλυνσης από συστατικό, συμπεριλαμβανομένων των γενετικώς τροποποιημένων υλικών, ή ουσία που αναμένεται να είναι ανομοιογενώς καταναμημένη στις πρώτες ύλες ζωοτροφών.

Εάν η ελεγκτική αρχή έχει βάσιμες υπόνοιες για ανομοιογενή κατανομή και στην περίπτωση διασταυρούμενης μόλυνσης από συστατικό ή ουσία σε σύνθετη ζωοτροφή, μπορούν να εφαρμοστούν οι ποσοτικές απαιτήσεις του κατωτέρω πίνακα.

Μέγεθος του δειγματοζόμενου τμήματος	Ελάχιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος (δόσεων)
< 80 τόνοι	Βλέπε ποσοτικές απαιτήσεις στο σημείο 5.1. Ο αριθμός των προς λήψη μερικών ποσοτήτων δείγματος πρέπει να πολλαπλασιάζεται επί 2,5.
≥ 80 τόνοι	100

5.3. Ποσοτικές απαιτήσεις για τις μερικές ποσότητες δείγματος στην περίπτωση των πολύ μεγάλων παρτίδων

Στην περίπτωση των πολύ μεγάλων δειγματοζόμενων τμημάτων (άνω των 500 τόνων), αριθμός των προς λήψη μερικών ποσοτήτων δείγματος = 40 μερικές ποσότητες δείγματος + $\sqrt{\text{τόνοι}}$, για τον έλεγχο ουσιών ή προϊόντων που είναι ομοιογενώς καταναμημένα σε ολόκληρη τη ζωοτροφή, ή = 100 μερικές ποσότητες δείγματος + $\sqrt{\text{τόνοι}}$, για τον έλεγχο συστατικών ή ουσιών που ενδέχεται να είναι ανομοιογενώς καταναμημένα στις πρώτες ύλες ζωοτροφών.

6. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Απαιτείται μόνο ένα συνολικό δείγμα ανά δειγματοζόμενο τμήμα.

	Είδος ζωοτροφών	Ελάχιστο μέγεθος συνολικού δείγματος (*) (**)
6.1.	Ασυσκεύαστες ζωοτροφές	4 kg
6.2.	Συσκευασμένες ζωοτροφές	4 kg (***)

▼ M3

Απαιτείται μόνο ένα συνολικό δείγμα ανά δειγματοζόμενο τμήμα		
	Είδος ζωοτροφών	Ελάχιστο μέγεθος συνολικού δείγματος (*) (**) (***)
6.3.	Υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές	4 λίτρα
6.4.	Κτηνοτροφικές πλάκες ή πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων:	
6.4.1.	βάρους άνω του 1 kg η καθεμία	4 kg
6.4.2.	βάρους έως 1 kg η καθεμία	το βάρος 4 αρχικών κτηνοτροφικών πλακών ή πλακών λείξης
6.5.	Χορτονομή	4 kg (****)

- (*) Στην περίπτωση των υψηλής αξίας ζωοτροφών, μπορεί να ληφθεί μικρότερη ποσότητα συνολικού δείγματος, υπό τον όρο ότι αυτό περιγράφεται και τεκμηριώνεται στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.
- (**) Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011 της Επιτροπής, της 24ης Ιουνίου 2011, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών, όσον αφορά την παρουσία γενετικώς τροποποιημένου υλικού για το οποίο εκκρεμεί διαδικασία έγκρισης ή του οποίου η έγκριση έχει λήξει (ΕΕ L 166 της 25.6.2011, σ. 9), το συνολικό δείγμα για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 35 000 σπέρματα/σπόρους. Αυτό συνεπάγεται ότι το μέγεθος του συνολικού δείγματος για τον αραβόσιτο πρέπει να είναι τουλάχιστον 10,5 kg και για τη σόγια 7 kg. Για άλλα σπέρματα και σπόρους, όπως το κριθάρι, το κεχρί, η βρώμη, το ρύζι, η σίκαλη, το σιτάρι και η κράμβη, τα 4 kg συνολικού δείγματος αντιστοιχούν σε πάνω από 35 000 σπέρματα.
- (***) Στην περίπτωση των συσκευασμένων ζωοτροφών μπορεί επίσης να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί το μέγεθος συνολικού δείγματος των 4 kg, ανάλογα με το μέγεθος των επιμέρους μονάδων.
- (****) Για χορτονομή χαμηλού ειδικού βάρους (π.χ. σανός, άχυρο), το ελάχιστο μέγεθος του συνολικού δείγματος θα πρέπει να είναι 1 kg.

7. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΑ ΤΕΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τελικά δείγματα

Απαιτείται η ανάλυση ενός τουλάχιστον τελικού δείγματος. Η ποσότητα του προς ανάλυση τελικού δείγματος δεν μπορεί να είναι μικρότερη από τις ακόλουθες ποσότητες:

Στερεές ζωοτροφές	500 g (*) (**) (***)
Υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές	500 ml (*)

- (*) Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011, το τελικό δείγμα για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10 000 σπέρματα/σπόρους. Αυτό συνεπάγεται ότι το μέγεθος του τελικού δείγματος για τον αραβόσιτο πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 000 g και για τη σόγια 2 000 g. Για άλλα σπέρματα και σπόρους, όπως το κριθάρι, το κεχρί, η βρώμη, το ρύζι, η σίκαλη, το σιτάρι και η κράμβη, τα 500 g τελικού δείγματος αντιστοιχούν σε πάνω από 10 000 σπέρματα.
- (**) Εάν το μέγεθος του συνολικού δείγματος είναι σημαντικά μικρότερο από 4 kg ή λίτρα (βλέπε υποσημειώσεις του κεφαλαίου 6), μπορεί και στην περίπτωση αυτή να ληφθεί μικρότερη ποσότητα τελικού δείγματος, υπό τον όρο ότι αυτό περιγράφεται και τεκμηριώνεται στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.
- (***) Για τη δειγματοληψία οσπρίων, σπόρων σιτηρών και καρπών με κέλυφος με σκοπό τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, το ελάχιστο μέγεθος του τελικού δείγματος είναι 1 kg, σύμφωνα με την οδηγία 2002/63/ΕΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 187 της 16.7.2002, σ. 30).

▼ M3

8. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΕΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ
Ή ΠΑΡΤΙΔΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΟΝΤΑΙ Ή ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ
ΜΕ ΤΡΟΠΟ ΠΟΥ ΚΑΘΙΣΤΑ ΑΝΕΦΙΚΤΗ ΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ
ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΗΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ

8.1. Γενικές αρχές

Εάν ο τρόπος μεταφοράς ή αποθήκευσης μιας παρτίδας δεν επιτρέπει τη λήψη μερικών ποσοτήτων δείγματος από το σύνολό της, η δειγματοληψία θα πρέπει κατά προτίμηση να διενεργείται στη διάρκεια της εκροής της παρτίδας.

Στην περίπτωση των μεγάλων αποθηκών ζωοτροφών, θα πρέπει να παροτρύνονται οι επιχειρήσεις να εγκαταστήσουν στις αποθήκες αυτές εξοπλισμό που καθιστά δυνατή την (αυτόματη) δειγματοληψία από το σύνολο κάθε αποθηκευμένης παρτίδας.

Σε περίπτωση εφαρμογής των διαδικασιών δειγματοληψίας που προβλέπονται στο παρόν κεφάλαιο 8, ενημερώνεται σχετικά η επιχείρηση ζωοτροφών ή ο αντιπρόσωπός της. Εάν η επιχείρηση ζωοτροφών ή ο αντιπρόσωπός της αμφισβητήσει τη διαδικασία δειγματοληψίας, οφείλει να δώσει τη δυνατότητα στην αρμόδια αρχή να λάβει δείγματα από το σύνολο της παρτίδας, με δικά του έξοδα.

8.2. Μεγάλες παρτίδες μεταφερόμενες με πλοία

8.2.1. Δυναμική δειγματοληψία μεγάλων παρτίδων που μεταφέρονται με πλοία

Η δειγματοληψία μεγάλων παρτίδων που βρίσκονται σε πλοία διενεργείται κατά προτίμηση στη διάρκεια της εκροής του προϊόντος (δυναμική δειγματοληψία).

Η δειγματοληψία πρέπει να εκτελείται ανά κύτος (ενότητα που μπορεί να διαχωριστεί με φυσικό μέσο). Ωστόσο τα κύτη εκκενώνονται διαδοχικά εν μέρει, με αποτέλεσμα να εκλείπει ο αρχικός φυσικός διαχωρισμός μετά τη μεταφορά στις εγκαταστάσεις αποθήκευσης. Συνεπώς, η δειγματοληψία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνάρτηση με τον αρχικό φυσικό διαχωρισμό ή με το διαχωρισμό μετά τη μεταφορά στις εγκαταστάσεις αποθήκευσης.

Η εκφόρτωση ενός πλοίου μπορεί να διαρκέσει πολλές ημέρες. Κατά κανόνα, η δειγματοληψία πρέπει να εκτελείται κατά τακτά διαστήματα σε όλη τη διάρκεια της εκφόρτωσης. Δεν είναι, όμως, πάντα εφικτή ή σκόπιμη η παρουσία επίσημου επιθεωρητή σε όλη τη διάρκεια της εκφόρτωσης. Για τον λόγο αυτό, επιτρέπεται η δειγματοληψία μέρους της συνολικής παρτίδας (δειγματιζόμενο τμήμα). Για τον προσδιορισμό του αριθμού των μερικών ποσοτήτων δείγματος λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος.

Σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

Η παρουσία επιθεωρητή είναι απαραίτητη έστω και αν το επίσημο δείγμα λαμβάνεται αυτόματα. Ωστόσο, σε περίπτωση αυτόματης δειγματοληψίας με προκαθορισμένες παραμέτρους, οι οποίες δεν είναι δυνατόν να μεταβληθούν κατά τη δειγματοληψία, και συλλογής των μερικών ποσοτήτων δείγματος σε σφραγισμένα δοχεία που αποκλείουν κάθε πιθανότητα απάτης, η παρουσία επιθεωρητή απαιτείται μόνο κατά την έναρξη και τη λήξη της δειγματοληψίας, καθώς και σε κάθε αναγκαία αλλαγή του δοχείου συλλογής των δειγμάτων.

▼ M3

8.2.2. Στατική δειγματοληψία παρτίδων που μεταφέρονται με πλοία

Για τη δειγματοληψία με στατική μέθοδο πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που προβλέπεται για τις εγκαταστάσεις αποθήκευσης (σιλό) οι οποίες είναι προσπελάσιμες από την κορυφή (βλέπε σημείο 8.4.1).

Η δειγματοληψία πρέπει να εκτελείται στο προσπελάσιμο τμήμα (από την κορυφή) της παρτίδας/του κύτους. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των μερικών ποσοτήτων δείγματος λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του δειγματοιζόμενου τμήματος. Σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

8.3. Δειγματοληψία μεγάλων παρτίδων σε αποθήκες

Η δειγματοληψία πρέπει να εκτελείται στο προσπελάσιμο τμήμα της παρτίδας. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των μερικών ποσοτήτων δείγματος λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του δειγματοιζόμενου τμήματος. Σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

8.4. Δειγματοληψία σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης (σιλό)

8.4.1. Δειγματοληψία σε (εύκολα) προσπελάσιμα από την κορυφή σιλό

Η δειγματοληψία πρέπει να εκτελείται στο προσπελάσιμο τμήμα της παρτίδας. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των μερικών ποσοτήτων δείγματος λαμβάνεται υπόψη το μέγεθος του δειγματοιζόμενου τμήματος. Σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

8.4.2. Δειγματοληψία σε απροσπέλαστα από την κορυφή σιλό (κλειστά σιλό)

8.4.2.1. Απροσπέλαστα από την κορυφή σιλό (κλειστά σιλό), χωρητικότητας 100 τόνων και άνω

Δεν είναι δυνατή η στατική δειγματοληψία των ζωοτροφών που αποθηκεύονται στις εγκαταστάσεις αυτές. Για τον λόγο αυτό, εάν πρέπει να διενεργηθεί δειγματοληψία στο σιλό και δεν υπάρχει δυνατότητα μετακίνησης του φορτίου, πρέπει να γίνει συνεννόηση με τον επιχειρηματία ώστε αυτός να ειδοποιήσει τον επιθεωρητή για τον χρόνο εκφόρτωσης του σιλό και να είναι δυνατή η δειγματοληψία κατά την εκροή της ζωοτροφής.

8.4.2.2. Απροσπέλαστα από την κορυφή σιλό (κλειστά σιλό), χωρητικότητας κάτω των 100 τόνων

Η διαδικασία δειγματοληψίας περιλαμβάνει τη μεταφορά ποσότητας 50 έως 100 kg σε δοχείο και τη λήψη του δείγματος από αυτή. Το μέγεθος του συνολικού δείγματος αντιστοιχεί στο σύνολο της παρτίδας, ενώ ο αριθμός των μερικών ποσοτήτων δείγματος συνδέεται με την ποσότητα που μεταφέρεται από το σιλό στο δοχείο για τη δειγματοληψία. Σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.

▼ M3

8.5. Δειγματοληψία ασυσκευάστων ζωοτροφών σε μεγάλα κλειστά εμπορευματοκιβώτια

Συχνά, η δειγματοληψία των παρτίδων αυτών είναι δυνατή μόνο κατά την εκφόρτωσή τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις η εκφόρτωση στο σημείο εισαγωγής ή ελέγχου είναι αδύνατη και, ως εκ τούτου, η δειγματοληψία θα πρέπει να διενεργείται κατά την εκφόρτωση των εν λόγω εμπορευματοκιβωτίων.

9. ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΗΨΗ, ΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

9.1. Γενικά

Τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται και να παρασκευάζονται χωρίς αδικαιολόγητη καθυστέρηση, λαμβανομένων υπόψη των απαραίτητων προφυλάξεων για την αποφυγή αλλοίωσης ή μόλυνσης του προϊόντος. Τα όργανα, οι επιφάνειες και τα δοχεία στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα πρέπει να είναι καθαρά και ξηρά.

9.2. Μερικές ποσότητες δείγματος

Οι μερικές ποσότητες δείγματος πρέπει να λαμβάνονται τυχαία από το σύνολο του δειγματοποιούμενου τμήματος και να είναι περίπου ισομεγέθεις.

Οι μερικές ποσότητες δείγματος έχουν μέγεθος τουλάχιστον 100 γραμμαρίων ή, στην περίπτωση των χορτονομών με χαμηλό ειδικό βάρος, 25 γραμμαρίων.

Εάν πρέπει να ληφθούν λιγότερες από 40 μερικές ποσότητες δείγματος, σύμφωνα με τους κανόνες της διαδικασίας δειγματοληψίας που καθορίζεται στο κεφάλαιο 8, το μέγεθος των μερικών ποσοτήτων δείγματος προσδιορίζεται σε συνάρτηση με το απαιτούμενο μέγεθος του συνολικού δείγματος που πρέπει να επιτευχθεί (βλέπε κεφάλαιο 6).

Σε περίπτωση δειγματοληψίας μικρών παρτίδων συσκευασμένων ζωοτροφών, όπου οι ποσοτικές απαιτήσεις επιβάλλουν να λαμβάνεται περιορισμένος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος, μερική ποσότητα δείγματος είναι το περιεχόμενο μιας αρχικής μονάδας που δεν υπερβαίνει το 1 kg ή 1 λίτρο.

Σε περίπτωση δειγματοληψίας συσκευασμένων ζωοτροφών που αποτελούνται από μικρές μονάδες (π.χ. κάτω των 250 g), το μέγεθος της μερικής ποσότητας δείγματος εξαρτάται από το μέγεθος της μονάδας.

9.2.1. Ασυσκευάστες ζωοτροφές

Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, η δειγματοληψία εκτελείται κατά τη μετακίνηση του δειγματοποιούμενου τμήματος (φόρτωση ή εκφόρτωση).

9.2.2. Συσκευασμένες ζωοτροφές

Αφού επιλεγεί ο απαιτούμενος αριθμός μονάδων για τη δειγματοληψία, όπως υποδεικνύεται στο κεφάλαιο 5, αφαιρείται μέρος του περιεχόμενου κάθε μονάδας με δειγματολήπτη τύπου λόγχης ή φτυάρι. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα λαμβάνονται μετά τη χωριστή εκκένωση των μονάδων.

9.2.3. Ομοιογενείς ή ομογενοποιημένες υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές

Αφού επιλεγεί ο απαιτούμενος αριθμός μονάδων για τη δειγματοληψία, όπως υποδεικνύεται στο κεφάλαιο 5, ομογενοποιείται το περιεχόμενο, εάν χρειάζεται, και λαμβάνεται μία ποσότητα από κάθε μονάδα.

Οι μερικές ποσότητες δείγματος μπορούν να ληφθούν κατά τη μετάγχιση του περιεχομένου.

▼ M3

9.2.4. *Μη ομογενοποιήσιμες υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές*

Αφού επιλεγεί ο απαιτούμενος αριθμός μονάδων για τη δειγματοληψία, όπως υποδεικνύεται στο κεφάλαιο 5, λαμβάνονται δείγματα από διάφορα επίπεδα.

Τα δείγματα μπορούν επίσης να ληφθούν κατά τη μετάγγιση του περιεχομένου. Στην περίπτωση αυτή, όμως, πρέπει να απορρίπτονται τα πρώτα κλάσματα.

Σε κάθε περίπτωση, ο λαμβανόμενος συνολικός όγκος δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 10 λίτρα.

9.2.5. *Κτηνοτροφικές πλάκες και πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων*

Αφού επιλεγεί ο απαιτούμενος αριθμός πλακών για τη δειγματοληψία, όπως υποδεικνύεται στο κεφάλαιο 5, μπορεί να ληφθεί ένα μέρος από κάθε πλάκα. Εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι η πλάκα δεν είναι ομοιογενής, μπορεί να ληφθεί ολόκληρη ως δείγμα.

Στην περίπτωση των κτηνοτροφικών πλακών ή πλακών λείξης των οποίων το βάρος δεν υπερβαίνει το 1 kg, μερική ποσότητα δείγματος είναι το περιεχόμενο μιας πλάκας.

9.3. **Παρασκευή των συνολικών δειγμάτων**

Οι μερικές ποσότητες δείγματος αναμειγνύονται για να σχηματιστεί ένα και μόνο συνολικό δείγμα.

9.4. **Παρασκευή των τελικών δειγμάτων**

Το υλικό του συνολικού δείγματος αναμειγνύεται επιμελώς ⁽¹⁾.

— Κάθε δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο περιέκτη/δοχείο. Λαμβάνονται όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις για να αποφεύγεται κάθε μεταβολή της σύνθεσης του δείγματος, μόλυνση ή αλλοίωση που θα μπορούσε να επέλθει κατά τη μεταφορά ή τη φύλαξη.

— Για τον έλεγχο συστατικών ή ουσιών που είναι ομοιογενώς κατανεμημένα σε ολόκληρη τη ζωοτροφή, το συνολικό δείγμα μπορεί να μειωθεί με αντιπροσωπευτικό τρόπο σε 2,0 kg ή 2,0 λίτρα τουλάχιστον (μειωμένο δείγμα) ⁽²⁾, κατά προτίμηση με μηχανικό ή αυτόματο διαρέτη. Για τον έλεγχο της παρουσίας υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε όσπρια, σπόρους σιτηρών και καρπούς με κέλυφος, το ελάχιστο μέγεθος του μειωμένου δείγματος είναι 3 kg. Εάν το είδος της ζωοτροφής δεν επιτρέπει τη χρήση διαρέτη ή εάν δεν υπάρχει διαρέτης, το δείγμα μπορεί να μειωθεί με τη μέθοδο της διαίρεσης σε τέταρτα (να τεταρτιστεί). Στη συνέχεια, από τα μειωμένα δείγματα παρασκευάζονται τα τελικά δείγματα (για τον έλεγχο, ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς), των οποίων η ποσότητα είναι περίπου ίδια και τα οποία ανταποκρίνονται στις ποσοτικές απαιτήσεις του κεφαλαίου 7. Για τον έλεγχο συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των γενετικώς τροποποιημένων υλικών, ή ουσιών που ενδέχεται να είναι ανομοιογενώς κατανεμημένα στις πρώτες ύλες ζωοτροφών, το συνολικό δείγμα:

— ομογενοποιείται πλήρως και έπειτα διαιρείται σε τελικά δείγματα ή

— μειώνεται σε 2,0 kg ή 2,0 λίτρα, τουλάχιστον ⁽³⁾, με μηχανικό ή αυτόματο διαρέτη. Μόνον εφόσον το είδος της ζωοτροφής δεν επιτρέπει τη χρήση διαρέτη, μπορεί το δείγμα να μειωθεί, εάν είναι απαραίτητο, με τη μέθοδο της διαίρεσης σε τέταρτα. Για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011, το μειωμένο δείγμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 35 000 σπέρματα/σπόρους ώστε να είναι δυνατόν να ληφθούν τελικά δείγματα για την επιβολή της νομοθεσίας, ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς που να περιέχουν τουλάχιστον 10 000 σπέρματα/σπόρους [βλ. υποσημείωση (**) στο κεφάλαιο 6 και υποσημείωση (*) στο κεφάλαιο 7].

⁽¹⁾ Τυχόν σβόλοι θραύονται (εάν χρειάζεται, αποχωρίζονται από το δείγμα και ενσωματώνονται πάλι σε αυτό).

⁽²⁾ Εκτός εάν πρόκειται για χορτονομή χαμηλού ειδικού βάρους.

⁽³⁾ Εκτός εάν πρόκειται για χορτονομή χαμηλού ειδικού βάρους.

▼ M3**9.5. Συσκευασία των δειγμάτων**

Οι περιέκτες ή οι συσκευασίες σφραγίζονται και επισημαίνονται κατά τρόπο ώστε να είναι αδύνατον να ανοιχθούν χωρίς να καταστραφεί η σφραγίδα. Η ετικέτα πρέπει να είναι εξ ολοκλήρου ενσωματωμένη στη σφραγίδα.

9.6. Αποστολή των δειγμάτων στο εργαστήριο

Τα δείγματα αποστέλλονται χωρίς καθυστέρηση στο αναλυτικό εργαστήριο που έχει οριστεί, συνοδευόμενα από τις απαραίτητες για την ανάλυση πληροφορίες.

10. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Για κάθε δείγμα συντάσσεται πρωτόκολλο το οποίο επιτρέπει την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση του δειγματιζόμενου τμήματος και του μεγέθους του.

Στο πρωτόκολλο αναφέρεται επίσης κάθε απόκλιση από τη διαδικασία δειγματοληψίας που προβλέπεται στον παρόντα κανονισμό.

Το πρωτόκολλο τίθεται στη διάθεση του εργαστηρίου επισήμου ελέγχου και, επιπλέον, στη διάθεση της επιχείρησης ζωοτροφών και/ή του εργαστηρίου που ορίζει η επιχείρηση ζωοτροφών.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Α. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Σκοπός

Οι διαδικασίες που περιγράφονται κατωτέρω αφορούν την προετοιμασία προς ανάλυση των δειγμάτων που αποστέλλονται στα εργαστήρια ελέγχου, μετά τη δειγματοληψία σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος I.

Τα εργαστηριακά δείγματα πρέπει να παρασκευάζονται κατά τρόπο ώστε οι ζυγιζόμενες ποσότητες, που προβλέπονται στις αναλυτικές μεθόδους, να είναι ομοιογενείς και αντιπροσωπευτικές των τελικών δειγμάτων.

2. Απαραίτητες προφυλάξεις

Η εφαρμοστέα διαδικασία παρασκευής δειγμάτων εξαρτάται από τις αναλυτικές μεθόδους που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν και από τα συστατικά ή ουσίες που πρόκειται να ελεγχθούν. Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να εξασφαλίζεται ότι η ακολουθούμενη διαδικασία παρασκευής δειγμάτων είναι κατάλληλη για τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδο και τα ελεγχόμενα συστατικά ή ουσίες.

Όλες οι απαραίτητες εργασίες πρέπει να διεξάγονται κατά τρόπο ώστε να αποφεύγονται, κατά το δυνατόν, η μόλυνση του δείγματος και οι μεταβολές της σύνθεσής του.

Η κονιοποίηση, η ανάμειξη και η κοσκίνιση εκτελούνται χωρίς καθυστέρηση και με ελαχιστοποίηση της έκθεσης του δείγματος στον αέρα και στο φως. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μύλοι και κονιοποιητές που ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική θέρμανση του δείγματος.

Συνιστάται η χειροκίνητη κονιοποίηση των ζωοτροφών που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στη θερμότητα. Πρέπει επίσης να εξασφαλίζεται ότι οι ίδιες οι συσκευές δεν αποτελούν πηγή μόλυνσης.

Εάν δεν είναι δυνατόν να παρασκευαστεί το δείγμα χωρίς σημαντική μεταβολή του ποσοστού υγρασίας σε αυτό, προσδιορίζεται η υγρασία του πριν και μετά την παρασκευή, με τη μέθοδο που καθορίζεται στο παράρτημα III μέρος Α.

3. Διαδικασία

3.1. Γενική διαδικασία

Από το τελικό δείγμα λαμβάνεται το γνωστό κλάσμα δοκιμασίας. Δεν συνιστάται κονιοποίηση και διαίρεση σε τέταρτα (coning and quartering), επειδή μπορεί να προκύψουν γνωστά κλάσματα δοκιμασίας με μεγάλο σφάλμα διαμερισμού.

3.1.1. Ζωοτροφές που μπορούν να κονιοποιηθούν ως έχουν

— Το κοσκινισμένο τελικό δείγμα αναμειγνύεται και συλλέγεται σε κατάλληλο καθαρό και ξηρό περιέκτη, εφοδιασμένο με αεροστεγές πόμα. Η ανάμειξη επαναλαμβάνεται αμέσως πριν από τη ζύγιση της προς ανάλυση ποσότητας (γνωστό κλάσμα δοκιμασίας), για να εξασφαλιστεί πλήρης ομογενοποίηση.

3.1.2. Ζωοτροφές που μπορούν να κονιοποιηθούν μετά από ξήρανση

— Εκτός αντίθετης διάταξης των αναλυτικών μεθόδων, το τελικό δείγμα ξηραίνεται έως ότου το ποσοστό υγρασίας του κατέλθει στο 8-12 %, με την εφαρμογή της διαδικασίας προκαταρκτικής ξήρανσης που περιγράφεται στο παράρτημα III, μέρος Α «Προσδιορισμός υγρασίας», σημείο 4.3. Στη συνέχεια εκτελούνται οι εργασίες που υποδεικνύονται στο σημείο 3.1.1.

▼ M3

3.1.3. Υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές

- Το τελικό δείγμα συλλέγεται σε κατάλληλο καθαρό και ξηρό περιέκτη, εφοδιασμένο με αεροστεγές πώμα. Αναμειγνύεται πλήρως, αμέσως πριν από τη ζύγιση της προς ανάλυση ποσότητας (γνωστό κλάσμα δοκιμασίας), για να εξασφαλιστεί πλήρης ομογενοποίηση.

3.1.4. Λοιπές ζωοτροφές

- Εάν δεν είναι δυνατόν να παρασκευαστούν τα τελικά δείγματα σύμφωνα με μια από τις ανωτέρω διαδικασίες, εφαρμόζεται άλλη διαδικασία που εξασφαλίζει ότι οι ζυγιζόμενες για την ανάλυση ποσότητες (γνωστά κλάσματα δοκιμασίας) είναι ομοιογενείς και αντιπροσωπευτικές των τελικών δειγμάτων.

3.2. *Ειδική διαδικασία για τις περιπτώσεις της οπτικής ή μικροσκοπικής εξέτασης και της ομογενοποίησης ολόκληρου του συνολικού δείγματος*

- Σε περίπτωση οπτικής εξέτασης (χωρίς τη χρήση μικροσκοπίου), χρησιμοποιείται για την εξέταση ολόκληρο το εργαστηριακό δείγμα.
- Σε περίπτωση μικροσκοπικής εξέτασης, το εργαστήριο μπορεί να μειώνει το συνολικό δείγμα ή να μειώνει περαιτέρω το μειωμένο δείγμα. Τα τελικά δείγματα ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς λαμβάνονται με διαδικασία ισοδύναμη με εκείνη που ακολουθείται όσον αφορά το τελικό δείγμα για την επιβολή της νομοθεσίας.
- Σε περίπτωση ομογενοποίησης ολόκληρου του συνολικού δείγματος, τα τελικά δείγματα λαμβάνονται από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα.

4. **Φύλαξη των δειγμάτων**

Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία που δεν μεταβάλλει τη σύνθεσή τους. Τα δείγματα που προορίζονται για την ανάλυση βιταμινών ή ιδιαίτερα φωτοευαίσθητων ουσιών φυλάσσονται σε συνθήκες που αποτρέπουν τη δυσμενή επίδραση του φωτός σε αυτά.

B. ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΤΙΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

1. Εκτός αντίθετης διάταξης των αναλυτικών μεθόδων, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας (pro analysis/p.a.). Για την ανάλυση ιχνοστοιχείων, η καθαρότητα των αντιδραστηρίων πρέπει να ελέγχεται με τυφλό πείραμα. Ανάλογα με το λαμβανόμενο αποτέλεσμα, ενδέχεται να απαιτείται επιπλέον καθαρισμός των αντιδραστηρίων.
2. Όταν στις αναλυτικές μεθόδους αναφέρονται εργασίες παρασκευής διαλυμάτων, αραιώσης, έκπλυσης ή πλύσης, χωρίς ένδειξη για το είδος του διαλύτη ή αραιωτικού μέσου, εννοείται ότι πρέπει να χρησιμοποιείται νερό. Κατά κανόνα, το νερό πρέπει να είναι απιονισμένο ή απεσταγμένο. Σε ειδικές περιπτώσεις, που επισημαίνονται στις μεθόδους ανάλυσης, το νερό πρέπει να υποβάλλεται σε ειδικές διαδικασίες καθαρισμού.
3. Λαμβανομένου υπόψη του συνήθους εξοπλισμού των εργαστηρίων ελέγχου, στις μεθόδους ανάλυσης αναφέρονται μόνο τα ειδικά όργανα και συσκευές ή εκείνα που απαιτούν συγκεκριμένο τρόπο χρήσης. Ο εξοπλισμός αυτός πρέπει να είναι καθαρός, ιδίως σε περίπτωση προσδιορισμού πολύ μικρών ποσοτήτων ουσιών.

▼ M3

Γ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Διαδικασία εκχύλισης

Σε πολλές μεθόδους καθορίζεται συγκεκριμένη διαδικασία εκχύλισης. Κατά κανόνα, μπορούν να εφαρμοστούν και άλλες διαδικασίες εκχύλισης πέραν της αναφερόμενης στη μέθοδο, υπό τον όρο ότι έχει αποδειχθεί ότι η απόδοση εκχύλισης της χρησιμοποιούμενης διαδικασίας εκχύλισης είναι ισοδύναμη, για την υπό ανάλυση μήτρα, με εκείνη της διαδικασίας που αναφέρεται στη μέθοδο.

2. Διαδικασία καθαρισμού

Σε πολλές μεθόδους καθορίζεται συγκεκριμένη διαδικασία καθαρισμού. Κατά κανόνα, μπορούν να εφαρμοστούν και άλλες διαδικασίες καθαρισμού πέραν της αναφερόμενης στη μέθοδο, υπό τον όρο ότι έχει αποδειχθεί ότι τα αναλυτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρησιμοποιούμενη διαδικασία καθαρισμού είναι ισοδύναμα, για την υπό ανάλυση μήτρα, με εκείνα της διαδικασίας που αναφέρεται στη μέθοδο.

3. Αριθμός προσδιορισμών

Στην περίπτωση της ανάλυσης ανεπιθύμητων ουσιών, εάν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού είναι σημαντικά μικρότερο ($> 50\%$) από την προς έλεγχο προδιαγραφή, δεν απαιτούνται πρόσθετοι προσδιορισμοί, υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας. Σε άλλες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ανάλυση εις διπλούν (δεύτερος προσδιορισμός) για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή συμπτωματικής ανάμειξης δειγμάτων. Για την εξακρίβωση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών, λαμβανομένης υπόψη της αβεβαιότητας μέτρησης.

Στην περίπτωση του ελέγχου της δηλούμενης περιεκτικότητας σε ουσία ή συστατικό, εάν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού επιβεβαιώνει τη δηλούμενη περιεκτικότητα, δηλαδή το αναλυτικό αποτέλεσμα περιλαμβάνεται στο αποδεκτό εύρος μεταβλητότητας της δηλούμενης περιεκτικότητας, δεν απαιτούνται πρόσθετοι προσδιορισμοί, υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας. Σε άλλες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ανάλυση εις διπλούν (δεύτερος προσδιορισμός) για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή συμπτωματικής ανάμειξης δειγμάτων. Για την εξακρίβωση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών, λαμβανομένης υπόψη της αβεβαιότητας μέτρησης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, το αποδεκτό εύρος μεταβλητότητας καθορίζεται στη νομοθεσία, λόγω χάριν στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 767/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 13ης Ιουλίου 2009, για τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση ζωοτροφών, την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, και την κατάργηση των οδηγιών 79/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 80/511/ΕΟΚ της Επιτροπής, 82/471/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 83/228/ΕΚ του Συμβουλίου, 93/74/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 93/113/ΕΚ του Συμβουλίου, 96/25/ΕΚ του Συμβουλίου, και της απόφασης 2004/217/ΕΚ της Επιτροπής⁽¹⁾.

4. Αναφορά της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου

Στη έκθεση ανάλυσης αναφέρεται η χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος.

5. Αναφορά των αναλυτικών αποτελεσμάτων

Τα αναλυτικά αποτελέσματα εκφράζονται όπως προβλέπεται στην αναλυτική μέθοδο, με κατάλληλο αριθμό σημαντικών ψηφίων, και διορθώνονται, εάν είναι απαραίτητο, για να ληφθεί υπόψη το ποσοστό υγρασίας του τελικού δείγματος πριν από την παρασκευή.

⁽¹⁾ ΕΕ L 229 της 1.9.2009, σ. 1.

▼ M3

6. **Αβεβαιότητα μέτρησης και ποσοστό ανάκτησης στην περίπτωση της ανάλυσης ανεπιθύμητων ουσιών**

Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ουσίες, κατά την έννοια της οδηγίας 2002/32/EK, ένα προϊόν που προορίζεται για ζωοτροφή θεωρείται ότι δεν συμμορφώνεται με την καθορισμένη μέγιστη περιεκτικότητα, εάν κριθεί ότι το αναλυτικό αποτέλεσμα, σε σχέση με ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %, υπερβαίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα, λαμβανομένων υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης και τη διόρθωσης ως προς την ανάκτηση. Για την εκτίμηση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά από διόρθωση ως προς την ανάκτηση και αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται μόνο στις περιπτώσεις όπου η αναλυτική μέθοδος επιτρέπει την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και τη διόρθωση ως προς την ανάκτηση (π.χ. δεν είναι εφικτή σε περίπτωση μικροσκοπικής εξέτασης).

Το αναλυτικό αποτέλεσμα αναφέρεται ως εξής (στον βαθμό που η χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος επιτρέπει την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και του ποσοστού ανάκτησης):

- α) διορθωμένο ως προς την ανάκτηση, με ένδειξη του ποσοστού ανάκτησης. Η εν λόγω διόρθωση δεν είναι απαραίτητη εάν το ποσοστό ανάκτησης κυμαίνεται μεταξύ 90 και 110 %·
- β) με τη μορφή «x +/- U», όπου x είναι το αναλυτικό αποτέλεσμα και U η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης, με τη χρήση παράγοντα κάλυψης 2, που παρέχει στάθμη εμπιστοσύνης περίπου 95 %.

Ωστόσο, εάν το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι σημαντικά μικρότερο (> 50 %) από την προς έλεγχο προδιαγραφή, και υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας και η ανάλυση χρησιμοποιείται με αποκλειστικό σκοπό τον έλεγχο της συμμόρφωσης προς τις νομοθετικές διατάξεις, το αναλυτικό αποτέλεσμα επιτρέπεται να αναφερθεί χωρίς διόρθωση ως προς την ανάκτηση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αναφορά του ποσοστού ανάκτησης και της αβεβαιότητας μέτρησης μπορεί να παραλείπεται..



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε υγρασία. Στην περίπτωση ζωοτροφών που περιέχουν πτητικές ουσίες, όπως οργανικά οξέα, πρέπει να σημειωθεί ότι μαζί με την περιεκτικότητα της υγρασίας προσδιορίζεται και μια σημαντική ποσότητα πτητικών ουσιών.

Η μέθοδος δεν αφορά την ανάλυση των γαλακτοκομικών προϊόντων ως πρώτων υλών ζωοτροφών, την ανάλυση των μεταλλικών ουσιών και των μειγμάτων, τα οποία αποτελούνται κυρίως από μεταλλικές ουσίες, την ανάλυση ζωικών και φυτικών λιπών και ελαίων, καθώς και την ανάλυση των ελαιούχων σπόρων και καρπών.

2. Αρχή

Το δείγμα ξηραίνεται υπό καθορισμένες συνθήκες οι οποίες διαφέρουν αναλόγως της φύσης της ζωοτροφής. Η απώλεια βάρους προσδιορίζεται με ζύγιση. Είναι απαραίτητο να διενεργείται προκαταρκτική ξήρανση, όταν πρόκειται για στερεά ζωοτροφή η οποία έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία.

3. Όργανα

3.1. Τριβείο αποτελούμενο από υλικό το οποίο δεν απορροφά υγρασία, είναι εύκολο στον καθαρισμό του, επιτρέπει ταχεία και ομοιόμορφη τριβή χωρίς να προκαλεί την παραγωγή αξιόλογης θερμότητας, δεν επιτρέπει κατά το δυνατόν την επαφή με τον εξωτερικό αέρα και ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις οι οποίες επισημαίνονται στις παραγράφους 4.1.1 και 4.1.2 (π.χ. σφυριά ή μικροτριβεία ψυχόμενα με νερό, κωνικοί λυόμενοι μύλοι, τριβεία βραδείας κίνησης ή οδοντωτών δίσκων).

3.2. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 1 mg.

3.3. Στεγνά μεταλλικά δοχεία από ανοξείδωτο μέταλλο ή από γυαλί, εφοδιασμένα με κάλυμμα το οποίο εξασφαλίζει αεροστεγές κλείσιμο. Ωφέλιμη επιφάνεια που επιτρέπει την κατανομή της ποσότητας του δείγματος σε αναλογία 0,3 g ανά cm² περίπου.

3.4. Ισοθερμικός κλίβανος αποξήρανσης (± 2 °C) ηλεκτρικής θέρμανσης που εξασφαλίζει ταχεία ρύθμιση της θερμοκρασίας και επαρκώς αεριζόμενος⁽¹⁾.

3.5. Ρυθμιζόμενος ηλεκτρικός κλίβανος κενού με ελαιοαντλία και με μηχανισμό εισαγωγής ξηρού και θερμού αέρα ή αφυδατικού μέσου (π.χ. οξειδίου του ασβεστίου).

3.6. Αποξηραντήρας με παχειά διάτρητη μεταλλική πλάκα ή πλάκα από πορσελάνη που περιέχει δραστικό αφυδατικό μέσο.

4. Διαδικασία

Σημείωση: Οι εργασίες που περιγράφονται στο παρόν μέρος πρέπει να διενεργούνται αμέσως μετά το άνοιγμα των συσκευασιών τα οποία περιέχουν τα δείγματα. Οι αναλύσεις πρέπει να διενεργούνται τουλάχιστον εις διπλούν.

⁽¹⁾ Για την ξήρανση των σιτηρών καθώς και των αλεύρων, χονδραλεύρων και σιμιγδαλιών, ο κλίβανος αποξήρανσης πρέπει να έχει θερμική απόδοση τέτοια ώστε ρυθμιζόμενος εκ των προτέρων στη θερμοκρασία των 131 °C, να δύναται να επανακτήσει τη θερμοκρασία αυτή νωρίτερα των 45 πρώτων λεπτών κατόπιν της τοποθέτησης σε αυτόν του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού των δειγμάτων για ταυτόχρονη ξήρανση. Ο αερισμός του κλίβανου αποξήρανσης πρέπει να είναι τέτοιος ώστε όλα μαζί τα δείγματα μαλακού σίτου, που είναι δυνατόν να χωρέσουν, ξηραίνόμενα επί δύο ώρες να δίδουν αποτελέσματα τα οποία να παρουσιάζουν διαφορά κατώτερη του 0,15 % σε σχέση με τα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται μετά από τετράωρη ξήρανση.

▼B

4.1. Προετοιμασία

4.1.1. Ζωοτροφές εκτός από εκείνες που εμπίπτουν στις παραγράφους 4.1.2 και 4.1.3

Λαμβάνεται ποσότητα δείγματος τουλάχιστον 50 g. Αν είναι απαραίτητο κονιοποιείται ή συνθλίβεται κατά τον ενδεδειγμένο τρόπο προς αποφυγή κάθε μεταβολής της περιεκτικότητας σε υγρασία (βλέπε παράγραφο 6).

4.1.2. Σιτηρά και χονδράλευρα

Λαμβάνεται ποσότητα τουλάχιστον 50 g δείγματος. Αλέθεται κατά τρόπο ώστε τα μύρια αυτού να διέρχονται τουλάχιστον κατά 50 % διά μέσου κοσκίνου των 0,5 mm και να μη συγκρατείται σε κόσκινο με στρογγυλά ανοίγματα 1 mm περισσότερο του 10 % του απορρίμματος.

4.1.3. Ρευστές ζωοτροφές ή πάστες, ζωοτροφές αποτελούμενες κυρίως από λιπαρές ύλες

Λαμβάνεται και ζυγίζεται ποσότητα δείγματος 25 g περίπου με προσέγγιση 10 mg, προστίθεται η ενδεδειγμένη ποσότητα άνυδρου άμμου η οποία έχει ζυγισθεί με προσέγγιση 10 mg και αναμειγνύεται μέχρι την επίτευξη ενός ομοιογενούς προϊόντος.

4.2. Αποξήρανση

4.2.1. Ζωοτροφές εκτός από εκείνες που εμπίπτουν στις παραγράφους 4.2.2 και 4.2.3

Λαμβάνεται το απόβαρο του δοχείου (3.3) με το κάλυμά του, με προσέγγιση 1 mg. Ζυγίζεται ποσότητα 5 g περίπου δείγματος, με προσέγγιση 1 mg μέσα στο δοχείο του οποίου το απόβαρο έχει ληφθεί και κατανέμεται ομοιόμορφα. Τοποθετείται το δοχείο χωρίς το κάλυμά του μέσα στον κλίβανο αποξήρανσης ο οποίος έχει προηγουμένως θερμανθεί σε 103 °C. Προς αποφυγή μεγάλης πτώσης της θερμοκρασίας του κλιβάνου αποξήρανσης το δοχείο εισάγεται το ταχύτερο δυνατόν. Αφήνεται να ξηρανθεί επί τέσσερις ώρες από τη στιγμή κατά την οποία η θερμοκρασία του κλιβάνου αποξήρανσης έχει επανέλθει στους 103 °C. Επανατοποθετείται το κάλυμμα στο δοχείο, το δοχείο εξάγεται από τον κλίβανο αποξήρανσης, αφήνεται να ψυχθεί επί 30 έως 45 πρώτα λεπτά εντός του αποξηραντήρα (3.6) και ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg περίπου.

Στην περίπτωση κατά την οποία οι ζωοτροφές συνίστανται ουσιαστικά σε λιπαρές ύλες διενεργείται συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών μέσα στον κλίβανο αποξήρανσης στους 130 °C. Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % της υγρασίας.

4.2.2. Σιτηρά, άλευρα, χονδράλευρα και σιμιγδάλια

Λαμβάνεται το απόβαρο του δοχείου (3.3) με το κάλυμά του, με προσέγγιση 0,5 mg. Ζυγίζεται ποσότητα 5 g περίπου κονιοποιημένου δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, μέσα στο δοχείο του οποίου το απόβαρο έχει ληφθεί και κατανέμεται ομοιόμορφα. Το δοχείο τοποθετείται χωρίς το κάλυμά του μέσα στον κλίβανο αποξήρανσης ο οποίος έχει προηγουμένως θερμανθεί στους 130 °C. Προς αποφυγή μεγάλης πτώσης της θερμοκρασίας του κλιβάνου αποξήρανσης, το δοχείο εισάγεται το ταχύτερο δυνατόν. Αφήνεται να ξηρανθεί επί δύο ώρες από τη στιγμή κατά την οποία η θερμοκρασία του κλιβάνου αποξήρανσης έχει επανέλθει στους 130 °C. Επανατοποθετείται το κάλυμμα στο δοχείο, το δοχείο εξάγεται από τον κλίβανο αποξήρανσης, αφήνεται να ψυχθεί επί 30 έως 45 λεπτά εντός του αποξηραντήρα (3.6) και ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg περίπου.

4.2.3. Σύνθετες ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο του 4 % σακχαρόζη ή λακτόζη: πρώτες ύλες ζωοτροφών όπως χαρούπια, αφυδατωμένα προϊόντα σιτηρών, φύτρα βύνης, λοβοί τεύλων, διαλυτοί ιχθείς και ζάχαρη. Σύνθετες ζωοτροφές που περιέχουν πάνω από 25 % μεταλλικά άλατα περιλαμβανομένου του νερού κρυσταλλοποίησης.

Λαμβάνεται το απόβαρο του δοχείου (3.3) με το κάλυμά του, με προσέγγιση 0,5 mg. Ζυγίζεται ποσότητα 5 g περίπου δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, εντός του δοχείου του οποίου το απόβαρο έχει ληφθεί και κατανέμεται ομοιόμορφα. Το δοχείο τοποθετείται χωρίς το κάλυμά του μέσα στον κλίβανο (3.5), ο οποίος έχει προηγουμένως θερμανθεί σε θερμοκρασία από 80 °C μέχρι 85 °C. Προς αποφυγή μεγάλης πτώσης της θερμοκρασίας του κλιβάνου το δοχείο εισάγεται το ταχύτερο δυνατόν.

Επιφέρεται πίεση 100 Torr και αφήνεται να ξηρανθεί στην πίεση αυτή επί τέσσερις ώρες, είτε σε ξηρό και θερμό ρεύμα αέρος, είτε με τη

▼ B

χρήση αφυδατικού μέσου (300 g περίπου για 20 δείγματα). Στην τελευταία περίπτωση διακόπτεται η σύνδεση με την αντλία κενού όταν επιτευχθεί η ως άνω πίεση. Η διάρκεια ξήρανσης μετράται από τη στιγμή κατά την οποία η θερμοκρασία του κλίβανου έχει επανέλθει στους 80 °C έως 85 °C. Ο κλίβανος επαναφέρεται στη συνέχεια με προσοχή σε ατμοσφαιρική πίεση. Ο κλίβανος ανοίγεται, καλύπτεται αμέσως το δοχείο με το κάλυμμά του, εξάγεται το δοχείο από τον κλίβανο, αφήνεται να ψυχθεί επί 30 έως 45 λεπτά εντός του αποξηραντήρα (3.6.) και ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg. Διενεργείται συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών μέσα στον κλίβανο κενού σε θερμοκρασία 80 °C έως 85 °C και ζυγίζεται εκ νέου. Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % της υγρασίας.

4.3. Προκαταρκτική ξήρανση

4.3.1. Ζωοτροφές εκτός από εκείνες που εμπίπτουν στην παράγραφο 4.3.2

Οι στερεές ζωοτροφές των οποίων η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι υψηλή και η κονιοποίηση καθίσταται δύσκολη πρέπει να υφίστανται προκαταρκτική ξήρανση ως ακολούθως:

Ζυγίζεται ποσότητα 50 g μη κονιοποιημένου δείγματος με προσέγγιση 10 mg (εφόσον είναι απαραίτητο, μπορεί να διενεργηθεί χονδρική σύνθλιψη στην περίπτωση συμπιεσμένων ή συσσωματωμένων τροφών) εντός κατάλληλου δοχείου (π.χ. πλάκα αλουμινίου των 20 × 12 cm με τοιχώματα 0,5 cm). Αφήνεται να ξηρανθεί μέσα στον κλίβανο αποξήρανσης σε θερμοκρασία 60 °C έως 70 °C μέχρις ότου η περιεκτικότητα σε υγρασία κατέλθει σε τιμή κυμαινόμενη μεταξύ 8 % και 12 %. Εξάγεται από τον κλίβανο αποξήρανσης, αφήνεται να ψυχθεί χωρίς κάλυμμα μέσα στο εργαστήριο επί μία ώρα και ζυγίζεται με προσέγγιση 10 mg. Στη συνέχεια, κονιοποιείται αμέσως όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 4.1.1 και διενεργείται η ξήρανση όπως υποδεικνύεται στις παραγράφους 4.2.1 ή 4.2.3, ανάλογα με τη φύση της ζωοτροφής.

4.3.2. Σιτηρά

Οι καρποί οι οποίοι έχουν ποσοστό υγρασίας ανώτερο του 17 % πρέπει να υφίστανται προκαταρκτική ξήρανση ως εξής:

Ζυγίζεται ποσότητα 50 g μη αλεσμένου σπόρου με προσέγγιση 10 mg μέσα σε κατάλληλο δοχείο (π.χ. πλάκα αλουμινίου των 20 × 12 cm με τοιχώματα 0,5 cm). Αφήνεται να ξηρανθεί μέσα σε κλίβανο αποξήρανσης επί 5 έως 7 λεπτά σε θερμοκρασία 130 °C. Εξάγεται από τον κλίβανο αποξήρανσης, αφήνεται να ψυχθεί χωρίς κάλυμμα μέσα στο εργαστήριο επί δύο ώρες και ζυγίζεται με προσέγγιση 10 mg. Στη συνέχεια, αλέθεται αμέσως όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 4.1.2 και διενεργείται η ξήρανση όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 4.2.2.

5. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε υγρασία (X) ως ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος υπολογίζεται με τους ακόλουθους τύπους:

5.1. Αποξήρανση χωρίς προκαταρκτική ξήρανση

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

όπου:

m = αρχικό βάρος, σε γραμμάρια, της ποσότητας του δείγματος,

m₀ = βάρος, σε γραμμάρια, της ξηρανθείσας ποσότητας του δείγματος.

5.2. Αποξήρανση με προκαταρκτική ξήρανση

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

όπου:

m = αρχικό βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος,

m₁ = βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος κατόπιν προκαταρκτικής ξήρανσης,

m₂ = βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος κατόπιν κονιοποίησης ή άλεσης,

m₀ = βάρος σε γραμμάρια της ξηρανθείσας ποσότητας του δείγματος.

▼B5.3. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο παράλληλαπαράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,2 % της απόλυτης τιμής της υγρασίας.

6. **Παρατήρηση**

Αν η κονιοποίηση αποδεικνύεται απαραίτητη και αν προκύπτει ότι αυτό εξασκεί κάποια μεταβολή της περιεκτικότητας σε υγρασία του προϊόντος, τα αποτελέσματα της ανάλυσης, τα οποία αναφέρονται στα συστατικά της ζωοτροφής, πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα με την περιεκτικότητα σε υγρασία του αρχικού δείγματος.

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΩΝ ΛΙΠΩΝ ΚΑΙ ΕΛΑΙΩΝ

1. **Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία (νερό και άλλες πτητικές ουσίες) των ζωικών και φυτικών λιπών και ελαίων.

2. **Αρχή**

Το δείγμα ξηραίνεται σε 103 °C μέχρι σταθερού βάρους (η απώλεια του βάρους μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγισμάτων πρέπει να είναι ίση ή κατώτερη του 1 mg). Η απώλεια βάρους προσδιορίζεται με ζύγιση.

3. **Όργανα**

- 3.1. Υποδοχέας (κάψα) επίπεδου πυθμένα από ανοξείδωτο υλικό, διαμέτρου 8 έως 9 cm και ύψους περίπου 3 cm.
- 3.2. Θερμόμετρο με ενισχυμένο βολβό και θάλαμο διαστολής στο άνω άκρο, διαβαθμισμένο μεταξύ 80 °C περίπου έως 110 °C τουλάχιστον και μήκους 10 cm περίπου.
- 3.3. Αμμόλουτρο ή θερμαινόμενη ηλεκτρική πλάκα.
- 3.4. Ξηραντήρας που περιέχει δραστικό αφυδατικό μέσο.
- 3.5. Αναλυτικός ζυγός.

4. **Διαδικασία**

Ζυγίζεται ποσότητα 20 g περίπου, με προσέγγιση 1 mg, του ομογενοποιημένου δείγματος εντός του ξηρού υποδοχέα (3.1), του οποίου έχει ληφθεί το απόβαρο και ο οποίος περιέχει το θερμόμετρο (3.2). Θερμαίνεται επί του αμμόλουτρου ή επί της θερμαινόμενης πλάκας (3.3), ανακινώντας σταθερά με το θερμόμετρο έτσι ώστε η θερμοκρασία να ανέλθει στους 90 °C εντός 7 περίπου λεπτών.

Μειώνεται η θερμότητα, ανάλογα με τη συχνότητα ανόδου των φυσαλίδων από τον πυθμένα του υποδοχέα. Η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβεί τους 105 °C. Συνεχίζεται η ανακίνηση αποξύνοντας τον πυθμένα του υποδοχέα μέχρι να παύσουν να δημιουργούνται φυσαλίδες.

Για να εξασφαλισθεί η πλήρης απομάκρυνση της υγρασίας, επαναλαμβάνεται πολλές φορές η θέρμανση στους 103 °C ± 2 °C, με ψύξη στους 93 °C μεταξύ των διαδοχικών θερμάνσεων. Ακολούθως αφήνεται να ψυχθεί εντός του ξηραντήρα (3.4) μέχρι θερμοκρασίας δωματίου και ζυγίζεται. Επαναλαμβάνεται η εργασία αυτή μέχρις ότου η απώλεια βάρους μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγίσεων να μην υπερβαίνει τα 2 mg.

Σημείωση: Αύξηση του βάρους του δείγματος κατόπιν επανειλημμένων θερμάνσεων δείχνει οξείδωση του λίπους. Στην περίπτωση αυτή το αποτέλεσμα υπολογίζεται από τη ζύγιση η οποία διενεργείται αμέσως πριν αρχίσει να αυξάνεται το βάρος.

5. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα σε υγρασία του δείγματος (*X*) δίδεται από τον τύπο:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

▼B

όπου:

m = βάρος, σε γραμμάρια, της ποσότητας του δείγματος,

m_1 = βάρος, σε γραμμάρια, του υποδοχέα και του περιεχομένου του πριν από τη θέρμανση,

m_2 = βάρος, σε γραμμάρια, του υποδοχέα και του περιεχομένου μετά τη θέρμανση.

Αποτελέσματα μικρότερα του 0,05 % πρέπει να καταχωρούνται με την ένδειξη «μικρότερα του 0,05 %».

Επαναληψιμότητα

Η διαφορά της υγρασίας μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που έγιναν στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,05 % σε απόλυτη τιμή.

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΟΛΙΚΕΣ ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ολικές αζωτούχες ουσίες βάσει της περιεκτικότητας σε άζωτο, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη μέθοδο Kjeldahl.

2. Αρχή

Το δείγμα ανοργανοποιείται με θειικό οξύ παρουσία καταλύτη. Το όξινο διάλυμα καθίσταται αλκαλικό με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η αμμωνία αποστάζεται και συλλέγεται μέσα σε καθορισμένη ποσότητα θειικού οξέος, η περίσσεια του οποίου ογκομετρείται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου.

Εναλλακτικά, η αμμωνία που εκλύεται αποστάζεται σε περίσσεια διαλύματος βορικού οξέος και, στη συνέχεια, ογκομετρείται με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος ή θειικού οξέος.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Θειικό κάλιο.

3.2. Καταλύτης: οξειδίο του (δισθενούς) χαλκού (CuO) ή θειικός χαλκός πεντάκις (δισθενής) ένυδρος $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3. Ψευδάργυρος υπό μορφή κόκκων.

3.4. Θειικό οξύ, πυκνότητας $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.

3.5. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.6. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.7. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

3.8. Δείκτης ερυθρό του μεθυλίου· διαλύονται 300 mg ερυθρού του μεθυλίου σε 100 ml αιθανόλης, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$.

3.9. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα του εμπορίου για τεχνικές χρήσεις) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.

3.10. Υδροξείδιο του νατρίου, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.11. Υδροξείδιο του νατρίου, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.12. Ελαφρόπετρα υπό μορφή κόκκων, η οποία έχει πλυθεί σε υδροχλωρικό οξύ και υποβληθεί σε ανάφλεξη.

3.13. Ακετανιλίδιο (σ.τ. = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, περιεκτικότητα αζώτου = $10,36 \text{ \%}$).

3.14. Σακχαρόζη (ελεύθερη αζώτου).

3.15. Βορικό οξύ (H_3BO_3).

3.16. Δείκτης ερυθρό του μεθυλίου· διαλύονται 100 mg ερυθρού του μεθυλίου σε 100 ml αιθανόλης ή μεθανόλης.

▼B

- 3.17. Διάλυμα πράσινου της βρωμοκρεζόλης: διαλύονται 100 mg πράσινου της βρωμοκρεζόλης σε 100 ml αιθανόλης ή μεθανόλης.
- 3.18. Διάλυμα βορικού οξέος (συγκέντρωσης 10 g/l έως 40 g/l ανάλογα με τα όργανα που χρησιμοποιούνται)

Όταν εφαρμόζεται η χρωματομετρική μέθοδος ανίχνευσης μέχρι το τέλος της αντίδρασης, οι δείκτες ερυθρό του μεθυλίου και πράσινο της βρωμοκρεζόλης πρέπει να προστίθενται στα διαλύματα βορικού οξέος. Αν παρασκευάζεται 1 λίτρο διαλύματος βορικού οξέος, πριν ρυθμιστεί ο όγκος του, πρέπει να προστεθούν 7 ml διαλύματος ερυθρού του μεθυλίου (3.16) και 10 ml διαλύματος πράσινου της βρωμοκρεζόλης (3.17).

Ανάλογα με την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται, το pH του διαλύματος βορικού οξέος μπορεί να διαφέρει από παρτίδα σε παρτίδα. Συχνά απαιτείται μια ρύθμιση με την προσθήκη μικρής ποσότητας αλκάλειας για να προκύψει ένα θετικό τυφλό δείγμα.

Σημείωση: Με την προσθήκη περίπου 3 ml έως 4 ml NaOH (3.11) σε 1 λίτρο διαλύματος βορικού οξέος συγκέντρωσης 10 g/l επιτυγχάνεται συνήθως επαρκής ρύθμιση. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστατεύεται από το φως και τις πηγές έκλυσης ατμών αμμωνίας κατά την αποθήκευση.

- 3.19. Υδροχλωρικό οξύ, πρότυπο διάλυμα, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Σημείωση: Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ογκομετρικά διαλύματα (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 και 3.19) διαφορετικών συγκεντρώσεων, αν η συγκέντρωση διορθωθεί για τους υπολογισμούς. Οι συγκεντρώσεις πρέπει πάντοτε να εκφράζονται με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

4. Όργανα

Συσκευή κατάλληλη για ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahl.

5. Διαδικασία

5.1. Ανοργανοποίηση

Ζυγίζουμε 1 g του δείγματος με ακρίβεια 0,001 g και το εισάγουμε στη φιάλη της συσκευής ανοργανοποίησης. Προσθέτουμε 15 g θεικού καλίου (3.1), την ενδεδειγμένη ποσότητα καταλύτου (3.2) (0,3 έως 0,4 g CuO ή 0,9 έως 1,2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 25 ml θεικού οξέος (3.4) και, αν χρειάζεται, μερικούς κόκκους ελαφρόπετρας (3.12) και αναμειγνύουμε.

Θερμαίνουμε τη φιάλη μετρίως στην αρχή, ανακινώντας από καιρού σε καιρό εάν είναι απαραίτητο, μέχρις ότου απανθρακωθεί η μάζα και εξαφανισθεί ο αφρός· εν συνεχεία θερμαίνουμε περισσότερο μέχρις ότου το υγρό αρχίσει να βράζει σταθερά. Η θέρμανση είναι επαρκής όταν οι ατμοί του ζέοντος οξέος υγροποιούνται πάνω στα τοιχώματα της φιάλης. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση των πλευρικών τοιχωμάτων καθώς και η προσκόλληση οργανικών σωματιδίων επ' αυτών.

Όταν το διάλυμα καταστεί διαυγές και αποκτήσει ανοικτό πράσινο χρώμα, αφήνεται να βράσει επί δύο ακόμη ώρες και εν συνεχεία αφήνεται να ψυχθεί.

5.2. Απόσταξη

Προσθέτουμε με προσοχή ικανή ποσότητα νερού ώστε τα θειικά άλατα να διαλυθούν πλήρως. Αφήνουμε το διάλυμα να ψυχθεί και προσθέτουμε εν συνεχεία μερικούς κόκκους ψευδαργύρου (3.3), αν απαιτείται. Συνεχίζουμε σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.1 ή 5.2.2.

5.2.1. Απόσταξη σε θειικό οξύ

Εισάγουμε στη φιάλη συλλογής της αποστακτικής συσκευής 25 ml (με ακρίβεια μετρημένα) θεικού οξέος (3.5) ή (3.7) ανάλογα με την κατ' εκτίμηση αναμενόμενη περιεκτικότητα σε άζωτο. Προσθέτουμε μερικές σταγόνες ερυθρού του μεθυλίου (3.8).

▼B

Συνδέουμε τη φιάλη ανοργανοποίησης με τον συμπυκνωτή της αποστακτικής συσκευής και βυθίζουμε το άκρο του συμπυκνωτή στο υγρό της φιάλης συλλογής μέχρι βάθους 1 cm τουλάχιστον (βλέπε παρατήρηση 8.3). Προσθέτουμε βραδέως 100 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.9) στη φιάλη ανοργανοποίησης προσέχοντας ώστε να μη σημειωθεί απώλεια αμμωνίας (βλέπε παρατήρηση 8.1). Θερμαίνουμε τη φιάλη μέχρι την απόσταξη όλης της αμμωνίας.

5.2.2. Απόσταξη σε βορικό οξύ

Στις περιπτώσεις όπου η ογκομέτρηση της περιεκτικότητας του αποστάγματος σε αμμωνία εκτελείται χειρωνακτικά, εφαρμόζεται η διαδικασία που αναφέρεται παρακάτω. Στις περιπτώσεις όπου η μονάδα απόσταξης είναι πλήρως αυτοματοποιημένη έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνει την ογκομέτρηση της περιεκτικότητας του αποστάγματος σε αμμωνία, ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή σχετικά με τη λειτουργία της μονάδας απόσταξης.

Τοποθετούμε μια φιάλη συλλογής που περιέχει 25 ml έως 30 ml διαλύματος βορικού οξέος (3.18) κάτω από το στόμιο εκροής του συμπυκνωτή με τέτοιο τρόπο ώστε ο σωλήνας διανομής να βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια της περίσσειας του διαλύματος βορικού οξέος. Ρυθμίζουμε τη μονάδα απόσταξης έτσι ώστε να παρέχει 50 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.9). Χρησιμοποιούμε τη μονάδα απόσταξης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αποστάζουμε την αμμωνία που εκλύεται με την προσθήκη του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου. Συλλέγουμε το απόσταγμα από το διάλυμα βορικού οξέος. Η ποσότητα του αποστάγματος (χρόνος απόσταξης με ατμό) εξαρτάται από την ποσότητα του αζώτου που περιέχεται στο δείγμα. Ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σημείωση: Σε μια ημιαυτόματη μονάδα απόσταξης, η προσθήκη περίσσειας υδροξειδίου του νατρίου και η απόσταξη με ατμό εκτελούνται αυτόματα.

5.3. Ογκομέτρηση

Σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.1 ή 5.3.2.

5.3.1. Θεϊκό οξύ

Ογκομετρείται η περίσσεια θεϊκού οξέος στη φιάλη συλλογής με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.10 ή 3.11) αναλόγως της συγκέντρωσης του χρησιμοποιηθέντος θεϊκού οξέος μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

5.3.2. Βορικό οξύ

Ογκομετρείται το περιεχόμενο της φιάλης συλλογής με το πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (3.19) ή με το πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα θεϊκού οξέος (3.6), χρησιμοποιώντας προχοΐδα και διαβάζοντας την ένδειξη για την ποσότητα του ογκομετρικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε.

Όταν εφαρμόζεται η χρωματομετρική μέθοδος ανίχνευσης μέχρι το τέλος της αντίδρασης, ως τέλος της αντίδρασης θεωρείται το πρώτο ίχνος ρόδινου χρώματος στο περιεχόμενο. Η ένδειξη της προχοΐδας εκτιμάται με προσέγγιση 0,05 ml. Ένας μαγνητικός δίσκος ανάδευσης με φωτεινή ένδειξη ή φωτομετρικός ανιχνευτής μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση του τέλους της αντίδρασης.

Αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει αυτόματα χρησιμοποιώντας μια αποστακτική συσκευή ατμού με αυτόματη ογκομέτρηση.

Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή σχετικά με τη λειτουργία της ειδικής αποστακτικής συσκευής ή αποστακτικής συσκευής/τιτλοδότη.

Σημείωση: Όταν χρησιμοποιείται αυτόματο σύστημα ογκομέτρησης, η ογκομέτρηση ξεκινά αμέσως μετά την έναρξη της απόσταξης και χρησιμοποιείται διάλυμα βορικού οξέος συγκέντρωσης 1 % (3.18).

▼ B

Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται πλήρως αυτοματοποιημένη μονάδα απόσταξης, η αυτόματη ογκομέτρηση της αμμωνίας μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με ανίχνευση του τέλους της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας ένα ποτενσιομετρικό σύστημα πεχαμέτρησης.

Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ένας αυτόματος τιτλοδότης, με πεχάμετρο. Το πεχάμετρο πρέπει να βαθμονομηθεί σωστά, στο εύρος pH 4 έως 7, ακολουθώντας τις συνήθεις εργαστηριακές διαδικασίες βαθμονόμησης πεχάμετρου.

Το τέλος της αντίδρασης ογκομέτρησης με βάση το pH είναι η τιμή pH 4,6 δηλαδή η κορυφή στην καμπύλη ογκομέτρησης (σημείο καμπής).

5.4. *Τυφλό πείραμα*

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιδραστήρια είναι ελεύθερα αζώτου, πραγματοποιούμε τυφλό πείραμα (ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση) χρησιμοποιώντας 1 g σακχαρόζης (3.14) αντί του δείγματος.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Οι υπολογισμοί εκτελούνται σύμφωνα με την παράγραφο 6.1. ή 6.2.

6.1. *Υπολογισμός για την ογκομέτρηση σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.1*

Η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες, ως κλάσμα βάρους, υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

όπου:

V_0 = είναι ο όγκος (σε ml) του NaOH (3.10 ή 3.11) που χρησιμοποιήθηκε κατά το τυφλό πείραμα,

V_1 = είναι ο όγκος (σε ml) του NaOH (3.10 ή 3.11) που χρησιμοποιήθηκε για την ογκομέτρηση του δείγματος,

c = είναι η συγκέντρωση (σε mol/l) του NaOH (3.10 ή 3.11),

m = είναι το βάρος του δείγματος (σε g).

6.2. *Υπολογισμός για την ογκομέτρηση σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2*

6.2.1. Ογκομέτρηση με υδροχλωρικό οξύ

Η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες, ως κλάσμα βάρους, υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

όπου:

m = είναι το βάρος της παρτίδας δοκιμής (σε g),

c = είναι η συγκέντρωση (σε mol/l) του πρότυπου ογκομετρικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.19),

V_0 = είναι ο όγκος (σε ml) του υδροχλωρικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε κατά το τυφλό πείραμα,

V_1 = είναι ο όγκος (σε ml) του υδροχλωρικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την παρτίδα δοκιμής.

6.2.2. Ογκομέτρηση με θειικό οξύ

Η περιεκτικότητα σε ολικές αζωτούχες ουσίες, ως κλάσμα βάρους, υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

▼B

όπου:

m = είναι το βάρος της παρτίδας δοκιμής (σε g),

c = είναι η συγκέντρωση (σε mol/l) του πρότυπο διαλύματος θειικού οξέος (3.6),

V_0 = είναι ο όγκος (σε ml) του θειικού οξέος (3.6) που χρησιμοποιήθηκε κατά το τυφλό πείραμα,

V_1 = είναι ο όγκος (σε ml) του θειικού οξέος (3.6) που χρησιμοποιήθηκε για την παρτίδα δοκιμής.

7. **Επαλήθευση της μεθόδου**

7.1. *Επαναληψιμότητα*

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

— το 0,2 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα αζωτούχων ουσιών μικρότερα από 20 %,

— το 1,0 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για επίπεδα από 20 % έως 40 %, και

— το 0,4 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα μεγαλύτερα από 40 %.

7.2. *Ακρίβεια της μεθόδου*

Η ανάλυση (ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση) διεξάγεται επί 1,5 έως 2,0 g ακετανιλιδίου (3.13) παρουσία 1 g σακχαρόζης (3.14). Για 1 g ακετανιλιδίου απαιτούνται 14,80 ml θειικού οξέος (3.5). Η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 99 %.

8. **Παρατηρήσεις**

8.1. Η συσκευή μπορεί να είναι χειροκίνητη, ημιαυτόματη ή αυτόματη. Αν η συσκευή είναι τέτοια ώστε μεταξύ ανοργανοποίησης και απόσταξης να χρειασθεί να γίνει μεταφορά, χρειάζεται προσοχή ώστε κατά τη μεταφορά αυτή να μη σημειωθούν απώλειες. Αν η φιάλη της αποστακτικής συσκευής δεν διαθέτει σταγονομετρικό χωνί, προσθέτουμε το υδροξείδιο του νατρίου αμέσως πριν από τη σύνδεση της φιάλης στο συμπυκνωτή, ρίχνοντας το υγρό σιγά-σιγά.

8.2. Εάν το προκύπτει από την ανοργανοποίηση υγρό πήγνυται, προβαίνουμε σε νέο προσδιορισμό χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα θειικού οξέος (3.4) από την ανωτέρω οριζόμενη.

8.3. Για προϊόντα χαμηλής περιεκτικότητας σε άζωτο, ο όγκος του θειικού οξέος (3.7) που εισάγεται στη φιάλη συλλογής μπορεί να μειωθεί, αν χρειασθεί, σε 10 ή 15 ml και να συμπληρωθεί με νερό μέχρι τα 25 ml.

8.4. Για συνήθεις αναλύσεις, μπορούν να εφαρμοστούν εναλλακτικές μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό των ολικών αζωτούχων ουσιών, αλλά η μέθοδος Kjeldahl που περιγράφεται στο παρόν μέρος Γ είναι η μέθοδος αναφοράς. Η ισοδυναμία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν με την εναλλακτική μέθοδο (π.χ. DUMAS) σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς πρέπει να αποδεικνύεται για κάθε επιμέρους μήτρα. Καθώς τα αποτελέσματα που προκύπτουν με μια εναλλακτική μέθοδο, ακόμα και μετά την επαλήθευση της ισοδυναμίας της μεθόδου, μπορεί να αποκλίνουν ελαφρώς από τα αποτελέσματα που προκύπτουν με τη μέθοδο αναφοράς, είναι απαραίτητο να αναφέρεται στην αναλυτική έκθεση η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών αζωτούχων ουσιών.

Δ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΙΑΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ουρία.

▼B**2. Αρχή**

Το δείγμα φέρεται εν αιωρήσει σε νερό παρουσία ενός βοηθητικού της στράγγισης παράγοντα. Το αιώρημα διηθείται. Η περιεκτικότητα σε ουρία του διηθήματος προσδιορίζεται μετά από προσθήκη 4-διμεθυλαμινοβενζαλδεϋδης (4-DMAB) και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 420 nm.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Διάλυμα 4-διμεθυλαμινοβενζαλδεϋδης: διαλύονται 1,6 g 4-DMAB σε 100 ml αιθανόλης 96 % και προστίθενται 10 ml υδροχλωρικού οξέος (ρ_{20} 1,19 g/ml). Αυτό το αντιδραστήριο διατηρείται κατ' ανώτατο όριο δύο εβδομάδες.

3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξικού ψευδαργύρου $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 3 g κρυσταλλικού οξικού οξέος. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.3. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.4. Ενεργός άνθραξ, μη προσροφών την ουρία (ελέγξιμο).

3.5. Διάλυμα 0,1 % (βάρος/όγκο) ουρίας.

4. Όργανα

4.1. Αναμείκτης (παλινδρομητής): περίπου 35 έως 40 στροφές ανά λεπτό.

4.2. Δοκιμαστικοί σωλήνες: 160 × 16 mm με εσφυρισμένα πόματα.

4.3. Φασματοφωτόμετρο.

5. Διαδικασία**5.1. Ανάλυση του δείγματος**

Ζυγίστε, με ακρίβεια 1 mg, 2 g δείγματος και τοποθετήστε τα μαζί με 1 g ενεργού άνθρακα (3.4) σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml. Προσθέστε 400 ml νερό και 5 ml από το διάλυμα Carrez I (3.2), αναμειξτε επί περίπου 30 δευτερόλεπτα και προσθέστε 5 ml από το διάλυμα Carrez II (3.3). Αναμειξτε επί 30 λεπτά στον παλινδρομητή. Συμπληρώστε μέχρι της χαραγής με νερό, ανακινήστε και διηθήστε.

Λάβετε 5 ml από το διαυγές και άχρουν διήθημα, φέρτε τα εντός των δοκιμαστικών σωλήνων με εσφυρισμένα πόματα, προσθέστε 5 ml διαλύματος 4-DMAB (3.1) και αναμειξτε. Τοποθετήστε τους σωλήνες μέσα σε υδατόλουτρο σε 20 °C (+/- 4 °C). Έπειτα από 15 λεπτά, μετρήστε την οπτική πυκνότητα του διαλύματος του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο στα 420 nm σε σύγκριση με τυφλό πείραμα.

5.2. Πρότυπη καμπύλη

Λάβετε όγκους 1, 2, 4, 5 και 10 ml από το διάλυμα ουρίας (3.5), φέρτε τους σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με νερό. Λάβετε 5 ml από κάθε διάλυμα, προσθέστε από 5 ml διαλύματος 4-DMAB (3.1), ομογενοποιήστε και μετρήστε την οπτική πυκνότητα όπως υποδεικνύεται ανωτέρω σε σύγκριση με διάλυμα μάρτυρα που περιέχει 5 ml 4-DMAB και 5 ml νερό, απαλλαγμένο ουρίας. Χαράξτε την πρότυπη καμπύλη.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστε την ποσότητα της ουρίας δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Εκφράστε το αποτέλεσμα επί τοις εκατό του δείγματος.

7. Παρατηρήσεις

7.1. Για περιεκτικότητες σε ουρία ανώτερες από 3 % μειώστε την ποσότητα δοκιμής σε 1 g ή αραιώστε το αρχικό διάλυμα για να μην έχετε περισσότερο από 50 mg ουρίας στα 500 ml.

▼B

- 7.2. Για χαμηλές περιεκτικότητες σε ουρία, αυξήστε την ποσότητα δοκιμής, αρκεί το διήθημα να παραμείνει διαυγές και άχρουν.
- 7.3. Αν το δείγμα περιέχει απλά αζωτούχα παράγωγα, όπως αμινοξέα, η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ενδείκνυται να πραγματοποιηθεί στα 435 nm.

E. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΒΑΣΕΩΝ**I. ΜΕ ΜΙΚΡΟΔΙΑΧΥΣΗ****1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πτητικές αζωτούχες βάσεις, εκπεφρασμένης σε αμμωνία.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με νερό και το διάλυμα διαυγάζεται και διηθείται. Οι πτητικές αζωτούχες βάσεις αντικαθίστανται με μικροδιάχυση με τη χρήση διαλύματος ανθρακικού καλίου, συλλέγονται σε διάλυμα βορικού οξέος και τιτλοδοτούνται με θειικό οξύ.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Διάλυμα τριχλωροξεικού οξέος 20 % (βάρος/όγκο).
- 3.2. Δείκτης: Διαλύονται 33 mg πρασίνου της βρωμοκρεζόλης και 65 mg ερυθρού του μεθυλίου εντός 100 ml αιθανόλης 95-96 % (κατ' όγκο).
- 3.3. Διάλυμα βορικού οξέος: Εντός ογκομετρικής φιάλης ενός λίτρου, διαλύονται 10 g βορικού οξέος σε 200 ml αιθανόλης 95-96 % (κατ' όγκο) και 700 ml νερού. Προστίθενται 10 ml δείκτη (3.2). Αναμειγνύονται και ρυθμίζεται, εφόσον είναι απαραίτητο, ο χρωματισμός του διαλύματος σε ανοικτό ερυθρό με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου. Ένα (1) ml του διαλύματος αυτού επιτρέπει τη δέσμευση κατ' ανώτατο όριο 300 μg NH_3 .
- 3.4. Κεκορεσμένο διάλυμα ανθρακικού καλίου: Ποσότητα 100 g ανθρακικού καλίου διαλύεται εντός 100 ml ζέοντος νερού. Αφήνεται να ψυχθεί και διηθείται.
- 3.5. Θειικό οξύ 0,01 mol/litre.

4. Όργανα

- 4.1. Αναμεικτήρας (παλινδρομητής): 35 έως 40 περίπου στροφές ανά λεπτό.
- 4.2. Κύτταρα Conway (βλέπε σχήμα), από γυαλί ή πλαστικό.
- 4.3. Μικροπροχοΐδες, διαβαθμισμένες σε 1/100 ml.

5. Διαδικασία

Ζυγίζεται ποσότητα 10 g δείγματος, με προσέγγιση 1 ml και εισάγεται με 100 ml νερού εντός ογκομετρικής φιάλης των 200 ml. Αναμειγνύεται ή αναδεύεται στον αναμεικτή επί 30 λεπτά. Προστίθενται 50 ml διαλύματος τριχλωροξεικού οξέος (3.1), συμπληρώνεται ο όγκος με νερό, ανακινείται έντονα και διηθείται μέσω πτυχωτού ηθμού.

Μέσω του σιφωνίου εισάγεται 1 ml διαλύματος βορικού οξέος (3.3) εντός του κεντρικού τμήματος του κυττάρου Conway και 1 ml του διηθήματος του δείγματος εντός της στεφάνης του κυττάρου. Καλύπτεται μερικώς με τη βοήθεια του λιπανθέντος καλύμματος. Αφήνεται να πέσει ταχέως εντός του δακτύλου 1 ml κεκορεσμένου διαλύματος ανθρακικού καλίου (3.4) και κλείεται το κάλυμμα αεροστεγώς. Το κύτταρο ταράσσεται με προσοχή κατά οριζόντια περιστροφική κίνηση για την εξασφάλιση της ανάμειξης των δύο αντιδραστηρίων. Αφήνεται προς επώαση επί τουλάχιστον τέσσερις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή επί μία ώρα σε 40 °C.

Τιτλοδοτούνται οι πτητικές βάσεις εντός του διαλύματος βορικού οξέος με θειικό οξύ (3.5) χρησιμοποιώντας μικροπροχοΐδα (4.3).

Διενεργείται τυφλό πείραμα εφαρμόζοντας τον ίδιο τρόπο εργασίας χωρίς το προς ανάλυση δείγμα.

▼B**6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Ένα (1) ml H_2SO_4 0,01 mol/litre αντιστοιχεί εις 0,34 mg αμμωνίας.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται επί τοις εκατό του δείγματος.

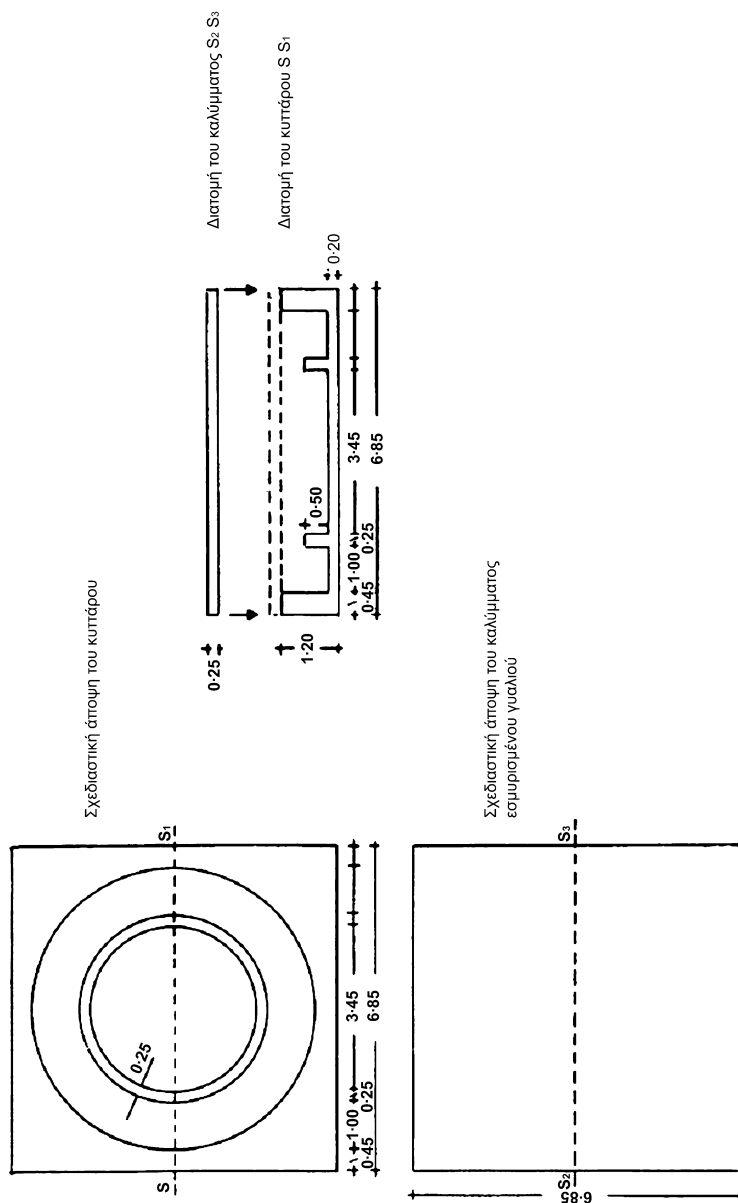
Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο παράλληλα διενεργουμένων προσδιορισμών επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το:

- 10 % σε σχετική τιμή για περιεκτικότητα σε αμμωνία μικρότερη του 1,0 %,
- 0,1 % σε απόλυτο τιμή για περιεκτικότητα σε αμμωνία ίση ή υψηλότερη του 1,0 %.

7. Παρατήρηση

Αν η περιεκτικότητα του δείγματος σε αμμωνία είναι υψηλότερη του 0,6 % αραιώνεται το αρχικό δείγμα.

ΚΥΤΤΑΡΟ CONWAY**Κλίμακα 1/1**

▼ B

II. ΜΕ ΑΠΟΣΤΑΣΗ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πτητικές αζωτούχες βάσεις, εκπεφρασμένες σε αμμωνία, των ιχθυαλεύρων τα οποία πρακτικώς δεν περιέχουν ουρία. Αύτη δεν είναι εφαρμόσιμη για περιεκτικότητες σε αμμωνία μικρότερες των 0,25 %.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με νερό και το διάλυμα διαυγάζεται και διηθείται. Οι πτητικές αζωτούχες βάσεις αντικαθίστανται στο σημείο ζέσεως με την προσθήκη οξειδίου του μαγνησίου και συλλέγονται εντός καθορισμένης ποσότητας θεικού οξέος, η περίσσεια του οποίου επανατιτλοδοτείται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Διάλυμα τριγλωροξεικού οξέος 20 % (βάρος/όγκο).
- 3.2. Οξείδιο του μαγνησίου.
- 3.3. Αντιαφριστικό γαλάκτωμα (για παράδειγμα σιλκόνη).
- 3.4. Θεικό οξύ 0,05 mol/litre.
- 3.5. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,1 mol/litre.
- 3.6. Διάλυμα 0,3 % ερυθρού του μεθυλίου εντός αιθανόλης 95-96 % (κατ' όγκο).

4. Όργανα

- 4.1. Αναμείκτης (παλινδρομητής): 35 έως 40 περίπου στροφές ανά λεπτό.
- 4.2. Συσκευή απόσταξης τύπου Kjeldahl.

5. Διαδικασία

Ζυγίζεται ποσότητα 10 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg και εισάγεται με 100 ml νερού εντός ογκομετρικής φιάλης των 200 ml. Αναμειγνύεται ή αναδεύεται στον αναμείκτη επί 30 λεπτά, προστίθενται 50 ml διαλύματος τριγλωροξεικού οξέος, συμπληρώνεται ο όγκος με νερό, ανακινείται έντονα και διηθείται μέσω πυκνωτού ηθμού.

Λαμβάνεται ποσότητα διαυγούς διηθήματος αναλόγως της υποτιθεμένης περιεκτικότητας σε πτητικές αζωτούχες βάσεις (γενικά ενδείκνυται 100 ml). Αραιώνεται στα 200 ml και προστίθενται 2 g οξειδίου του μαγνησίου (3.2) και ορισμένες σταγόνες αντιαφρώδους γαλακτώματος (3.3). Το διάλυμα πρέπει να είναι αλκαλικό σε χάρτη ηλιοτροπίου, διαφορετικά προστίθεται μια ποσότητα οξειδίου του μαγνησίου (3.2). Η διαδικασία συνεχίζεται σύμφωνα με τις παραγράφους 5.2 και 5.3 της μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ολικές αζωτούχες ουσίες (μέρος Γ του παρόντος παραρτήματος).

Διενεργείται τυφλό πείραμα εφαρμόζοντας τον ίδιο τρόπο εργασίας χωρίς το προς ανάλυση δείγμα.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

1 ml H₂SO₄ 0,05 mol/litre αντιστοιχεί σε 1,7 mg αμμωνίας

Το αποτέλεσμα εκφράζεται επί τοις εκατό του δείγματος.

Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο παράλληλα διενεργουμένων προσδιορισμών επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει σε σχετική τιμή, το 10 % της αμμωνίας.

ΣΤ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ (ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ ΘΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ)

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των ελεύθερων (συνθετικών και φυσικών) και ολικών (ενωμένων σε πεπτίδια και ελεύθερων) αμινοξέων

▼B

στις ζωοτροφές με αναλυτή αμινοξέων. Μπορεί να εφαρμοστεί στα ακόλουθα αμινοξέα: κυστ(ε)ίνη, μεθειονίνη, λυσίνη, θρεονίνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαργινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη, σερίνη, τυροσίνη και βαλίνη.

Η μέθοδος δεν κάνει διάκριση μεταξύ των αλάτων των αμινοξέων ούτε και μπορεί να επιτύχει διαφοροποίηση μεταξύ των μορφών D και L των αμινοξέων. Δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της θρυπτοφάνης και των υδροξυλιωμένων παραγώγων των αμινοξέων.

2. Αρχή

2.1. Ελεύθερα αμινοξέα

Τα προστιθέμενα ελεύθερα αμινοξέα εκχυλίζονται με τη βοήθεια αραιού υδροχλωρικού οξέος. Τα συνεκχυλιζόμενα αζωτούχα μακρομόρια καθιζάνουν με σουλφοσαλικυλικό οξύ και απομακρύνονται με διήθηση. Το pH του διηθήματος ρυθμίζεται στο 2,20. Τα αμινοξέα διαχωρίζονται με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και προσδιορίζονται με αντίδραση με νινυδρίνη και φωτομετρική ανίχνευση στα 570 nm.

2.2. Ολικά αμινοξέα

Ο τρόπος εργασίας εξαρτάται από τα εξεταζόμενα αμινοξέα. Η κυστ(ε)ίνη και η μεθειονίνη πρέπει να οξειδώνονται προς κυστεϊνικό οξύ και σουλφονή μεθειονίνης πριν από την υδρόλυση. Η τυροσίνη πρέπει να προσδιορίζεται σε υδρόλυμα μη οξειδωμένων δειγμάτων. Όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα που αναφέρονται στο σημείο 1 μπορούν να προσδιορίζονται είτε σε οξειδωμένο είτε σε μη οξειδωμένο δείγμα.

Η οξείδωση πραγματοποιείται στους 0 °C με μείγμα υπερμυρμηκικού οξέος και φαινόλης. Η περίσσεια του οξειδωτικού αντιδραστήριου αποσυντίθεται με διθειώδες νάτριο. Το δείγμα, οξειδωμένο ή μη, υδrolύεται με υδροχλωρικό οξύ (3.20) επί 23 ώρες. Το pH του υδrolύματος ρυθμίζεται στο 2,20. Τα αμινοξέα διαχωρίζονται με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και προσδιορίζονται με αντίδραση με νινυδρίνη και φωτομετρική ανίχνευση στα 570 nm (440 nm στην περίπτωση της προλίνης).

3. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιείται δισαπασταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας (αγωγιμότητα < 10 μS).

3.1. Υπεροξείδιο του υδρογόνου, w (w/w) = 30 %.

3.2. Μυρμηκικό οξύ, w (w/w) = 98-100 %.

3.3. Φαινόλη.

3.4. Διθειώδες νάτριο.

3.5. Υδροξείδιο του νατρίου.

3.6. Διένυδρο 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ.

3.7. Υδροχλωρικό οξύ, πυκνότητας περίπου 1,18 g/ml.

3.8. Διένυδρο κιτρικό νάτριο.

3.9. 2,2'-θειοδιαιθανόλη (θειοδιγλυκόλη).

3.10. Χλωριούχο νάτριο.

3.11. Νινυδρίνη.

3.12. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40-60 °C.

3.13. Νορλευκίνη, ή άλλη ένωση κατάλληλη για χρήση ως εσωτερικό πρότυπο.

▼B

- 3.14. Αέριο άζωτο (< 10 ppm οξυγόνο).
- 3.15. 1-οκτανόλη.
- 3.16. Αμινοξέα.
- 3.16.1. Οι τυπικές ουσίες που αναφέρονται στην παράγραφο 1. Καθαρές ενώσεις που δεν περιέχουν νερό κρυσταλλοποίησης. Ξηραίνονται υπό κενό υπεράνω P_2O_5 ή H_2SO_4 για 1 εβδομάδα πριν από τη χρήση.
- 3.16.2. Κυστεϊνικό οξύ.
- 3.16.3. Σουλφόνη μεθειονίνης.
- 3.17. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
Διαλύονται 300 g NaOH (3.5) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.18. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Διαλύονται 40 g NaOH (3.5) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.19. Διάλυμα μυρμηκικού οξέος-φαινόλης:
Αναμειγνύονται 889 g μυρμηκικού οξέος (3.2) με 111 g νερού και προστίθενται 4,73 g φαινόλης (3.3).
- 3.20. Μείγμα υδρόλυσης, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ που περιέχει 1 g φαινόλης/l:
Προστίθεται 1 g φαινόλης (3.3) σε 492 ml HCl (3.7) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.21. Μείγμα εκχύλισης, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ που περιέχει 2 % θειοδιγλυκόλη: λαμβάνονται 8,2 ml HCl (3.7), αραιώνονται με περίπου 900 ml νερού, προστίθενται 20 ml θειοδιγλυκόλης (3.9) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό, (τα 3.7 και 3.9 δεν πρέπει να αναμειγνύονται απευθείας).
- 3.22. 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ $\beta = 6 \%$:
Διαλύονται 60 g 5-σουλφοσαλικυλικού οξέος (3.6) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.23. Μείγμα οξειδωσης (υπερμυρμηκικό οξύ-φαινόλη):
Αναμειγνύονται 0,5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (3.1) με 4,5 ml διαλύματος μυρμηκικού οξέος-φαινόλης (3.19) σε ένα μικρό γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Αφήνεται προς επώαση στους 20-30 °C για 1 ώρα για να σχηματιστεί το υπερμυρμηκικό οξύ, και στη συνέχεια ψύχεται σε λουτρό νερού/πάγου (15 λεπτά) πριν προστεθεί στο δείγμα.
Προσοχή: αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και φοράτε προστατευτικά ρούχα.
- 3.24. Διάλυμα κιτρικού άλατος, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
Διαλύονται 19,61 g κιτρικού νατρίου (3.8), 5 ml θειογλυκόλης (3.9), 1 g φαινόλης (3.3) και 16,50 ml HCl (3.7) σε περίπου 800 ml νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 2,20. Το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.25. Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, το οποίο παρασκευάζεται ανάλογα με τις συνθήκες του αναλυτή που χρησιμοποιείται (4.9).
- 3.26. Αντιδραστήριο νινυδρίνης, το οποίο παρασκευάζεται ανάλογα με τις συνθήκες του αναλυτή που χρησιμοποιείται (4.9).
- 3.27. Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων. Τα εν λόγω διαλύματα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C.

▼B

3.27.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αμινοξέων (3.16.1).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ για κάθε αμινοξύ.

Διατίθεται στο εμπόριο.

3.27.2. Αρχικό πρότυπο διάλυμα κυστεϊνικού οξέως και σουλφόνης μεθειονίνης, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Διαλύονται 0,2115 g κυστεϊνικού οξέως (3.16.2) και 0,2265 g σουλφόνης μεθειονίνης (3.16.3) σε διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24) σε μια ογκομετρική φιάλη 1 l και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με διάλυμα κιτρικού οξέος. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C για 12 μήνες το πολύ. Το εν λόγω διάλυμα δεν χρησιμοποιείται αν το αρχικό πρότυπο διάλυμα (3.27.1) περιέχει κυστεϊνικό οξύ και σουλφόνη μεθειονίνη.

3.27.3. Αρχικό πρότυπο διάλυμα του εσωτερικού προτύπου π.χ. νορλευκίνη, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Διαλύονται 0,6560 g νορλευκίνης (3.13) σε διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24) σε μια ογκομετρική φιάλη και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 250 ml με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C για 6 μήνες το πολύ.

3.27.4. Διάλυμα βαθμονόμησης πρότυπων αμινοξέων για χρήση με υδρολύματα, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ κυστεϊνικού οξέως και σουλφόνης μεθειονίνης και $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ για τα υπόλοιπα αμινοξέα. Διαλύονται 2,2 g χλωριούχου νατρίου (3.10) σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως 100 ml με 30 ml διαλύματος κιτρικού οξέος (3.24). Προστίθενται 4,00 ml αρχικού πρότυπου διαλύματος αμινοξέων (3.27.1), 4,00 ml αρχικού πρότυπου διαλύματος κυστεϊνικού οξέως και σουλφόνης μεθειονίνης (3.27.2) και 0,50 ml αρχικού πρότυπου διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.27.3), αν χρησιμοποιούνται. Το pH ρυθμίζεται στο 2,20 με υδροξείδιο του νατρίου (3.18).

Μεταγγίζεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 50 ml. Το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή της φιάλης με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24) και αναμειγνύεται.

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C για 3 μήνες το πολύ.

Βλέπε επίσης παρατηρήσεις 9.1

3.27.5. Διάλυμα βαθμονόμησης πρότυπων αμινοξέων για χρήση με υδρολύματα το οποίο παρασκευάζεται σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.3.1 και για χρήση με εκχυλίσματα (5.2). Το διάλυμα βαθμονόμησης παρασκευάζεται σύμφωνα με την παράγραφο 3.27.4 αλλά παραλείποντας το χλωριούχο νάτριο.

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C για 3 μήνες το πολύ.

4. Όργανα

4.1. Σφαιρική φιάλη 100 ή 250 ml που φέρει κάθετο ψυκτήρα.

4.2. Φιάλη από βοροπυριτικό γυαλί 100 ml με βιδωτό πόμα με επένδυση από καουτσούκ/τεφλόν (π.χ. Duran, Schott) για χρήση σε ξηραντήρα.

4.3. Ξηραντήρας με δυναμικό αερισμό και ρυθμιστή θερμοκρασίας ακρίβειας υψηλότερης από $\pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

4.4. pH-μετρο (με ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων).

4.5. Φίλτρο μεμβράνης (0,22 μm).

4.6. Μηχανή φυγοκέντρωσης.

4.7. Περιστροφικός εξατμιστής κενού.

4.8. Μηχανικό τάρακτρο (σείκερ) ή μαγνητικός αναδευτήρας.

▼B

- 4.9. Αναλυτής αμινοξέων ή εξοπλισμός HPLC με ιοντοανταλλακτική στήλη, συσκευή για νινυδρίνη, παραγωγή μετά τη στήλη και φωτομετρικό ανιχνευτή.

Πραγματοποιείται πλήρωση της στήλης με θειούχες ρητίνες πολυστυρένιου, κατάλληλες για το διαχωρισμό των αμινοξέων μεταξύ τους και για το διαχωρισμό από άλλα υλικά θετικά στη νινυδρίνη. Η ροή μέσα στους κλάδους με το ρυθμιστικό διάλυμα και τη νινυδρίνη εξασφαλίζεται με αντλίες σταθερότητας ροής $\pm 0,5$ % κατά την περίοδο που καλύπτει τόσο την εκτέλεση της πρότυπης βαθμονόμησης όσο και την ανάλυση του δείγματος.

Με ορισμένους αναλυτές αμινοξέων είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαδικασίες υδρόλυσης όπου το υδρόλυμα έχει συγκέντρωση νατρίου $c = 0,8$ mol/l και περιέχει όλο το μυρμηκικό οξύ που απομένει μετά το στάδιο της οξειδωσης. Άλλοι πάλι δεν εξασφαλίζουν τον ικανοποιητικό διαχωρισμό ορισμένων αμινοξέων αν το υδρόλυμα περιέχει περίσσεια μυρμηκικού οξέος ή/και έχει υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου. Σε αυτή την περίπτωση, μειώνεται ο όγκος των οξέων με εξάτμιση σε περίπου 5 ml μετά την υδρόλυση και πριν από τη ρύθμιση του pH. Η εξάτμιση πρέπει να εκτελείται υπό κενό και σε ανώτατη θερμοκρασία 40 °C.

5. Διαδικασία

5.1. Παρασκευή δειγμάτων

Το δείγμα αλέθεται ώστε να διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο οπών 0,5 mm. Δείγματα με υψηλή υγρασία πρέπει είτε να ξηραίνονται με αέρα σε θερμοκρασία μη υπερβαίνουσα τους 50 °C ή να ξηραίνονται με ψύξη πριν από την άλεση. Δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος πρέπει να εκχυλίζονται με πετρελαϊκό αιθέρα (3.12) πριν από την άλεση.

5.2. Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοξέων σε ζωοτροφές και προμείγματα

Σε κωνική φιάλη ζυγίζεται με προσέγγιση 0,2 mg κατάλληλη ποσότητα (1-5 g) του παρασκευασθέντος δείγματος (5.1). Προστίθενται 100,0 ml μείγματος εκχύλισης (3.21). Το σύνολο ανακινείται ή αναμειγνύεται επί 60 λεπτά χρησιμοποιώντας μηχανικό τάρακτρο ή μαγνητικό αναδευτήρα (4.8). Το ίζημα αφήνεται να κατακαθίσει και 10,0 ml του υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρονται με σιφόνιο σε ποτήρι ζέσεως 100 ml.

Προστίθενται 5,0 ml διαλύματος σουλφοσαλικυλικού οξέος (3.22), αναδεύοντας με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα υποβάλλεται σε διήθηση ή φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση τυχόν ιζήματος. Τοποθετούνται 10,0 ml του διαλύματος που προκύπτει σε ποτήρι ζέσεως 100 ml και ρυθμίζεται το pH στο 2,20 χρησιμοποιώντας διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18). Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη κατάλληλου όγκου χρησιμοποιώντας διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24), και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή της φιάλης με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24).

Αν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται 1,00 ml εσωτερικού προτύπου (3.27.3) ανά 100 ml τελικού διαλύματος και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24).

Ακολουθεί χρωματογράφιση σύμφωνα με την παράγραφο 5.4.

Εάν τα εκχυλίσματα δεν εξεταστούν την ίδια ημέρα, πρέπει να φυλαχθούν σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C.

5.3. Προσδιορισμός των συνολικών αμινοξέων

5.3.1. Οξείδωση

Ζυγίζονται με προσέγγιση 0,2 mg από 0,1 έως 1 g του παρασκευασθέντος δείγματος (5.1) σε:

— σφαιρική φιάλη 100 ml (4.1) για ανοικτή υδρόλυση (5.3.2.3), ή

▼B

— σφαιρική φιάλη 250 ml (4.1) αν απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση νατρίου (5.3.3.1), ή

— φιάλη 100 ml με βιδωτό πώμα (4.2), για κλειστή υδρόλυση (5.3.2.4).

Η ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε άζωτο περίπου 10 mg και περιεκτικότητα σε υγρασία όχι μεγαλύτερη των 100 mg.

Η φιάλη ψύχεται μέσα σε λουτρό νερού-πάγου στους 0 °C, προστίθενται 5 ml μείγματος οξειδωσης (3.23) και αναμειγνύεται χρησιμοποιώντας γυάλινη σπαθίδα με κυρτή άκρη. Η φιάλη μαζί με τη σπαθίδα σφραγίζεται με αεροστεγή μεμβράνη. Τα λουτρό νερού/πάγου που περιέχει τη σφραγισμένη φιάλη τοποθετείται σε ψυγείο στους 0 °C και αφήνεται για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες, η φιάλη εξάγεται από το ψυγείο και η περίσσεια του οξειδωτικού αντιδραστηρίου αποσυντίθεται προσθέτοντας 0,84 g διθειώδους νατρίου (3.4).

Ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.2.1.

5.3.2. Υδρόλυση

5.3.2.1. Υδρόλυση οξειδωμένων δειγμάτων

Στο οξειδωμένο δείγμα που παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.1 προστίθενται 25 ml μείγματος υδρόλυσης (3.20), φροντίζοντας να εκπλυθούν τυχόν κατάλοιπα δείγματος που παραμένουν στα τοιχώματα του δοχείου και στη σπαθίδα.

Ανάλογα με τη διαδικασία υδρόλυσης που χρησιμοποιείται, ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

5.3.2.2. Υδρόλυση μη οξειδωμένων δειγμάτων

Ζυγίζονται, είτε σε μια σφαιρική φιάλη 100 ml ή 250 ml (4.1) είτε σε μια φιάλη 100 ml με βιδωτό πώμα (4.2), με προσέγγιση 0,2 mg, από 0,1 έως 1 g του δείγματος που παρασκευάστηκε (5.1). Η ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε άζωτο περίπου 10 mg. Προστίθενται προσεκτικά 25 ml μείγματος υδρόλυσης (3.20) και αναμειγνύονται με το δείγμα. Ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

5.3.2.3. Ανοικτή υδρόλυση

Προστίθενται 3 γυάλινες σφαίρες στο μείγμα της φιάλης (το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2.1 ή 5.3.2.2) και θερμαίνεται στο σημείο βρασμού με συνεχή παραγωγή φυσαλίδων υπό αναρρόη για 23 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί η υδρόλυση, ο ψυκτήρας εκπλύνεται με 5 ml διαλύματος κιτρικού οξέος (3.24). Η φιάλη αποσυνδέεται και ψύχεται σε λουτρό πάγου.

Ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.3.

5.3.2.4. Κλειστή υδρόλυση

Η φιάλη με το μείγμα που παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2.1 ή 5.3.2.2 τοποθετείται σε ξηραντήρα (4.3) στους 110 °C. Κατά την πρώτη ώρα της ξήρανσης, για να αποφευχθεί η υπερβολική αύξηση της πίεσης (λόγω της έκλυσης αέριων ουσιών) και τυχόν έκρηξη, το βιδωτό πώμα τοποθετείται πάνω στο στόμιο του δοχείου. Η φιάλη δεν πρέπει να σφραγισθεί με το βιδωτό πώμα. Μετά από μία ώρα, η φιάλη σφραγίζεται με το πώμα και αφήνεται στον ξηραντήρα (4.3) για 23 ώρες. Όταν ολοκληρωθεί η υδρόλυση, η φιάλη εξάγεται από τον ξηραντήρα, ξεβιδώνεται προσεκτικά το πώμα και η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό νερού/πάγου. Αφήνεται να ψυχθεί.

Ανάλογα με τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH (5.3.3), το περιεχόμενο της φιάλης μεταγγίζεται ποσοτικά σε ένα ποτήρι ζέσεως 250 ml ή μια σφαιρική φιάλη 250 ml, χρησιμοποιώντας διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24).

Ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.3.

▼B

5.3.3. Ρύθμιση του pH

Ανάλογα με την ανοχή του αναλυτή αμινοξέων στο νάτριο (4.9), για τη ρύθμιση του pH ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.3.1 ή 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Για τα χρωματογραφικά συστήματα (4.9) που απαιτούν χαμηλή συγκέντρωση νατρίου*

Κρίνεται σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί αρχικό πρότυπο διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (3.27.3), όταν χρησιμοποιούνται αναλυτές αμινοξέων που απαιτούν χαμηλή συγκέντρωση νατρίου (εφόσον πρέπει να μειωθεί ο όγκος του όξινου διαλύματος).

Σε αυτή την περίπτωση προστίθενται 2,00 ml αρχικού προτύπου διαλύματος του εσωτερικού προτύπου (3.27.3) στο υδρόλυμα πριν από την εξάτμιση.

Προστίθενται 2 σταγόνες 1-οκτανόλης (3.15) στο υδρόλυμα το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

Χρησιμοποιώντας έναν περιστροφικό εξάτμιστή κενού (4.7), ο όγκος μειώνεται σε 5-10 ml, υπό κενό, στους 40 °C. Αν ο όγκος μειωθεί κατά λάθος κάτω των 5 ml, το υδρόλυμα πρέπει να απορριφθεί και η ανάλυση να γίνει από την αρχή.

Το pH ρυθμίζεται στο 2,20 με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18) και ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.4.

5.3.3.2. *Για όλους τους υπόλοιπους αναλυτές αμινοξέων (4.9)*

Λαμβάνονται τα υδρόλυμα που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.2.3 ή 5.3.2.4 και υποβάλλονται σε μερική εξουδετέρωση, προσθέτοντας προσεκτικά και με ταυτόχρονη ανάδευση 17 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.17), διατηρώντας τη θερμοκρασία κάτω από τους 40 °C.

Το pH ρυθμίζεται στο 2,20 σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.17) και, τέλος, διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18). Ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 5.3.4.

5.3.4. Διάλυμα δείγματος για χρωματογράφιση

Το υδρόλυμα με το ρυθμισμένο pH (5.3.3.1 ή 5.3.3.2) μεταγγίζεται ποσοτικά με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24) σε ογκομετρική φιάλη 200 ml και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24).

Αν δεν έχει χρησιμοποιηθεί ήδη εσωτερικό πρότυπο, προστίθενται 2,00 ml εσωτερικού προτύπου (3.27.3) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24). Το διάλυμα αναμειγνύεται πολύ καλά.

Ακολουθεί χρωματογράφιση σύμφωνα με την παράγραφο 5.4.

Εάν τα εκχυλίσματα δεν εξεταστούν την ίδια ημέρα, πρέπει να φυλαχθούν σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C.

5.4. Χρωματογράφιση

Πριν από τη χρωματογράφιση, το εκχύλισμα (5.2) ή το υδρόλυμα (5.3.4) ρυθμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αναμειγνύεται καλά και διηθείται κατάλληλη ποσότητα με φίλτρο μεμβράνης 0,22 μm (4.5). Το διανυγές διάλυμα που προκύπτει υποβάλλεται σε χρωματογράφιση ιοντοανταλλαγής, χρησιμοποιώντας αναλυτή αμινοξέων (4.9).

Η έγχυση μπορεί να εκτελεστεί διά χειρός ή αυτόματα. Είναι σημαντικό να προστεθεί η ίδια ποσότητα διαλύματος $\pm 0,5 \%$ στη στήλη για την ανάλυση των προτύπων και των δειγμάτων, εκτός αν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, και οι αναλογίες νατρίου/αμινοξέων στα πρότυπα διαλύματα και στα διαλύματα δείγματος να είναι παρόμοιες, όσο αυτό είναι πρακτικά δυνατόν.

▼B

Σε γενικές γραμμές, η συχνότητα των κύκλων βαθμονόμησης εξαρτάται από τη σταθερότητα του αντιδραστήριου νινυδρίνης και από το αναλυτικό σύστημα. Το πρότυπο ή το δείγμα αραιώνεται με διάλυμα κιτρικού οξέος (3.24), προκειμένου η περιοχή μεγίστων του προτύπου να αντιστοιχεί σε 30-200 % της περιοχής μεγίστων των αμινοξέων του δείγματος.

Η χρωματογράφιση αμινοξέων διαφοροποιείται ελαφρώς ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή και τη ρητίνη που χρησιμοποιείται. Το επιλεγμένο σύστημα πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίζει τα αμινοξέα μεταξύ τους, καθώς και από άλλα υλικά θετικά στη νινυδρίνη. Εντός του εύρους λειτουργίας του χρωματογραφικού συστήματος πρέπει να εμφανιστεί μια γραμμική απόκριση στις μεταβολές των ποσοτήτων των αμινοξέων που προστίθενται στη στήλη.

Κατά τη χρωματογράφιση, η αναλογία ύψους ελαχίστων/μεγίστων που αναφέρεται παρακάτω ισχύει όταν αναλύεται ένα ισομοριακό διάλυμα (των υπό προσδιορισμό αμινοξέων). Το εν λόγω ισομοριακό διάλυμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 30 % της μέγιστης ποσότητας κάθε αμινοξέως που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια με το σύστημα του αναλυτή αμινοξέων (4.9).

Για τον διαχωρισμό θρεονίνης-σερίνης, η αναλογία ύψους ελαχίστων/μεγίστων του κατώτερου από τα δύο αλληλεπικαλυπτόμενα αμινοξέα στο χρωματογράφημα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 2:10 (αν προσδιορίζονται μόνο κυστ(ε)ίνη, μεθειονίνη, θρεονίνη και λυσίνη, ο ανεπαρκής διαχωρισμός από τα γειτονικά μέγιστα θα επηρεάσει αρνητικά τον προσδιορισμό). Για όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα, ο διαχωρισμός πρέπει να είναι καλύτερος από 1:10.

Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει τον διαχωρισμό της λυσίνης από «τεχνητά σφάλματα λυσίνης» και από την ορνιθίνη.

6. Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Το εμβαδόν των κορυφών του δείγματος και του προτύπου μετράται για κάθε επιμέρους αμινοξύ και η ποσότητα (X), σε g αμινοξέως ανά kg δείγματος, υπολογίζεται με τον τύπο.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Αν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, ο τύπος πολλαπλασιάζεται επί: $\frac{D}{C}$

A = εμβαδόν κορυφής, υδρόλυμα ή εκχύλισμα

B = εμβαδόν κορυφής, εσωτερικό πρότυπο

C = εμβαδόν κορυφής, εσωτερικό πρότυπο σε υδρόλυμα ή εκχύλισμα

D = εμβαδόν κορυφής, εσωτερικό πρότυπο, πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης

M = μοριακό βάρος του υπό προσδιορισμό αμινοξέως

c = συγκέντρωση προτύπου σε μmol/ml

m = βάρος δείγματος (g) (διορθωμένο στο αρχικό βάρος αν είναι αποξηραμένο ή απολιπωμένο)

V = ml συνολικού υδρολύματος (5.3.4) ή ml του υπολογιζόμενου συνολικού όγκου αραίωσης του εκχυλίσματος (6.1)

Η κυστίνη και η κυστεΐνη προσδιορίζονται και οι δύο ως κυστεϊνικό οξύ σε υδρολύματα οξειδωμένου δείγματος, υπολογίζονται όμως ως κυστίνη ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) χρησιμοποιώντας την τιμή M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Η μεθειονίνη προσδιορίζεται ως σουλφονή μεθειονίνης σε υδρολύματα οξειδωμένου δείγματος, υπολογίζεται όμως ως μεθειονίνη χρησιμοποιώντας την τιμή M = 149,21 g/mol για τη μεθειονίνη.

▼B

Η προστιθέμενη ελεύθερη μεθειονίνη προσδιορίζεται έπειτα από εκχύλιση ως μεθειονίνη. Για τον υπολογισμό, χρησιμοποιείται η ίδια τιμή Μ.

- 6.1. Ο ολικός μετά την αραίωση όγκος των εκχυλισμάτων (F) για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων (5.2) υπολογίζεται ως εξής:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = όγκος του τελικού εκχυλίσματος

7. Αξιολόγηση της μεθόδου

Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε διεθνή διεργαστηριακή σύγκριση που έγινε το 1990 χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικές ζωοτροφές (αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων, φύραμα πουλερικών, συμπύκνωμα πρωτεΐνης, προμείγματα). Τα αποτελέσματα, μετά την αφαίρεση των εκτός κλίμακας αποκλίσεων, της μέσης και της σταθερής απόκλισης δίδονται στους πίνακες που ακολουθούν:

Μέσοι όροι σε g/kg

Υλικό αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Φύραμα πουλερικών	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Πρόμειγμα	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

7.1. Επαναληψιμότητα

Τιμές επαναληψιμότητας για τα εξετασθέντα αμινοξέα. Η επαναληψιμότητα εκφραζόμενη ως «τυπική απόκλιση εντός εργαστηρίου» της προαναφερθείσας διεργαστηριακής σύγκρισης, εμφανίζεται στους ακόλουθους πίνακες:

Τυπική απόκλιση εντός εργαστηρίου (S_r) σε g/kg

Υλικό αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Φύραμα πουλερικών	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Πρόμειγμα	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

▼ B

Συντελεστής διακύμανσης (%) για την τυπική απόκλιση εντός εργαστηρίου (S_r)

Υλικό αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Φύραμα πουλερικών	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Πρόμειγμα	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

7.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Τα σχετικά αποτελέσματα για την τυπική απόκλιση μεταξύ εργαστηρίων για τη διεργαστηριακή σύγκριση που αναφέρθηκε παραπάνω, εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Τυπική απόκλιση μεταξύ εργαστηρίων (S_R) σε g/kg

Υλικό αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Φύραμα πουλερικών	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Πρόμειγμα	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

Συντελεστής διακύμανσης (%) για την τυπική απόκλιση μεταξύ εργαστηρίων (S_R)

Υλικό αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Φύραμα πουλερικών	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Πρόμειγμα	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

▼B**8. Χρήση υλικών αναφοράς**

Η σωστή εφαρμογή της μεθόδου ελέγχεται πραγματοποιώντας επανειλημμένες μετρήσεις των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που είναι διαθέσιμα. Συνιστάται η διακρίβωση με πιστοποιημένο διάλυμα διακριβώσεων αμινοξέων.

9. Παρατηρήσεις

- 9.1. Λόγω διαφορών μεταξύ αναλυτών αμινοξέων, ως κατευθυντήρια οδός πρέπει να χρησιμοποιούνται οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων διακρίβωσης των αμινοξέων (βλέπε παραγράφους 3.27.4 και 3.27.5) και του υδρολύματος (βλέπε παράγραφο 5.3.4).

Το πεδίο της γραμμικής ανταπόκρισης της συσκευής, πρέπει να ελεγχθεί για όλα τα αμινοξέα.

Το πρότυπο διάλυμα διαλύεται με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού άλατος προκειμένου να παρουσιασθούν οι περιοχές αιχμής στο μέσο του πεδίου.

- 9.2. Όταν για την ανάλυση των προϊόντων υδρόλυσης χρησιμοποιείται εξοπλισμός υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, οι πειραματικές συνθήκες πρέπει να βελτιστοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- 9.3. Με την εφαρμογή της μεθόδου σε ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο από 1 % χλωρίδιο (συμπκνώματα, ανόργανες ζωοτροφές, συμπληρωματικές ζωοτροφές) θα μπορούσε να υπάρξει εκτίμηση κατώτερη της κανονικής όσον αφορά τη μεθειονίνη και πρέπει να υπάρξει ειδική αγωγή.

Z. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΘΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ**1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της συνολικής και της ελεύθερης θρυπτοφάνης σε ζωοτροφές. Δεν γίνεται διάκριση μεταξύ D- και L-μορφών.

2. Αρχή

Για τον προσδιορισμό της συνολικής θρυπτοφάνης, το δείγμα υδρολύεται υπό αλκαλικές συνθήκες με κορεσμένο διάλυμα υδροξειδίου του βαρίου και θερμαίνεται στους 110 °C για 20 ώρες. Μετά την υδρόλυση, προστίθεται εσωτερικό πρότυπο.

Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης θρυπτοφάνης, το δείγμα εκχυλίζεται υπό ήπιες όξινες συνθήκες παρουσία εσωτερικού προτύπου.

Η θρυπτοφάνη και το εσωτερικό πρότυπο στο υδρόλυμα ή στο εκχύλισμα προσδιορίζονται μέσω HPLC με ανίχνευση φθορισμού.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Πρέπει να χρησιμοποιείται δισαπασταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας (αγωγιμότητα < 10 μS/cm).
- 3.2. Πρότυπη ουσία: θρυπτοφάνη (καθαρότητα/περιεκτικότητα ≥ 99 %) ξηρανθείσα υπό κενό υπέρανω πεντοξειδίου του φωσφόρου.
- 3.3. Ουσία εσωτερικού προτύπου: α-μεθυλο-θρυπτοφάνη (καθαρότητα/περιεκτικότητα ≥ 99 %), ξηρανθείσα υπό κενό υπέρανω πεντοξειδίου του φωσφόρου.
- 3.4. Οκταένυδρο υδροξείδιο του βαρίου [πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε το Ba(OH)₂ · 8 H₂O να μην εκτίθεται υπερβολικά στον αέρα για την αποφυγή σχηματισμού BaCO₃, πράγμα το οποίο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον προσδιορισμό] (βλέπε παρατήρηση 9.3).
- 3.5. Υδροξείδιο του νατρίου.
- 3.6. Ορθοφωσφορικό οξύ, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Υδροχλωρικό οξύ, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8. Μεθανόλη, καθαρότητας ισοδύναμης HPLC.
- 3.9. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40-60 °C.

▼B

- 3.10. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, $c = 1 \text{ mol/l}$:
40,0 g NaOH (3.5) διαλύονται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό (3.1).
- 3.11. Υδροχλωρικό οξύ, $c = 6 \text{ mol/l}$:
Λαμβάνονται 492 ml HCl (3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.12. Υδροχλωρικό οξύ, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Λαμβάνονται 82 ml HCl (3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.13. Υδροχλωρικό οξύ, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Λαμβάνονται 8,2 ml HCl (3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.
- 3.14. Ορθοφωσφορικό οξύ, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Λαμβάνονται 34 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.6) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό (3.1).
- 3.15. Πυκνό διάλυμα θρυπτοφάνης (3.2), $c = 2,50 \text{ μmol/ml}$:
Σε ογκομετρική φιάλη 500 ml διαλύονται 0,2553 g θρυπτοφάνης (3.2) σε υδροχλωρικό οξύ (3.13) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ (3.13). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους -18°C για τέσσερις εβδομάδες το πολύ.
- 3.16. Πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, $c = 2,50 \text{ μmol/ml}$:
Σε ογκομετρική φιάλη 500 ml διαλύονται 0,2728 g α-μεθυλο-θρυπτοφάνης (3.3) σε υδροχλωρικό οξύ (3.13) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ (3.13). Αποθηκεύεται στους -18°C για τέσσερις εβδομάδες το πολύ.
- 3.17. Πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης θρυπτοφάνης και εσωτερικού προτύπου:
Λαμβάνονται 2,00 ml πυκνού διαλύματος θρυπτοφάνης (3.15), και 2,00 ml πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (α-μεθυλο-θρυπτοφάνη) (3.16). Αραιώνονται με νερό (3.1) και μεθανόλη (3.8) μέχρι περίπου τον ίδιο όγκο και την ίδια περίπου συγκέντρωση μεθανόλης (10-30 %) όπως και το τελικό υδρόλυμα.

Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

Κατά τη διάρκεια της παρασκευής, προστατεύεται από το άμεσο ηλιακό φως.
- 3.18. Οξικό οξύ
- 3.19. 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλη.
- 3.20. Αιθανολαμίνη w (w/w) > 98 %.
- 3.21. Διάλυμα 1 g 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλης (3.19) σε 100 ml μεθανόλης (3.8).
- 3.22. Κινητή φάση για HPLC: 3,00 g οξικό οξύ (3.18) + 900 ml νερό (3.1) + 50,0 ml διάλυμα (3.21) 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλης (3.19) σε μεθανόλη (3.8) (1g/100ml). Το pH ρυθμίζεται στο 5,00 με αιθανολαμίνη (3.20). Συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (3.1).
4. **Όργανα**
- 4.1. Εξοπλισμός HPLC με φασματοφθορισμομετρικό ανιχνευτή.
- 4.2. Υγρή χρωματογραφική στήλη, 125 mm × 4 mm, C₁₈, 3 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη.
- 4.3. pH-μετρο.
- 4.4. Φιάλη πολυπροπυλενίου, χωρητικότητας 125 ml, ευρύλαιμη και με βιδωτό πώμα.

▼B

- 4.5. Φίλτρο μεμβράνης 0,45 μm .
- 4.6. Αυτόκλειστο, 110 ($\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 1,4 ($\pm$ 0,1) bar.
- 4.7. Μηχανικό τάρακτρο (σείκερ) ή μαγνητικός αναδευτήρας.
- 4.8. Αναμείκτης vortex.

5. Διαδικασία

5.1. Παρασκευή δειγμάτων

Το δείγμα αλέθεται ώστε να διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο οπών 0,5 mm. Δείγματα με υψηλή υγρασία πρέπει είτε να ξηραίνονται με αέρα σε θερμοκρασία μη υπερβαίνουσα τους 50 $^{\circ}\text{C}$ ή να ξηραίνονται με ψύξη πριν από την άλεση. Δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος πρέπει να εκχυλίζονται με πετρελαϊκό αιθέρα (3.9) πριν από την άλεση.

5.2. Προσδιορισμός ελεύθερης θρυπτοφάνης (εκχύλισμα)

Σε κωνική φιάλη, ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg κατάλληλη ποσότητα (1-5 g) του παρασκευασθέντος δείγματος (5.1). Προστίθενται 100,0 ml υδροχλωρικό οξύ, (3.13) και 5,00 ml πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου (3.16). Το σύνολο ανακινείται ή αναμειγνύεται επί 60 min χρησιμοποιώντας μηχανικό τάρακτρο ή μαγνητικό αναδευτήρα (4.7). Το ίζημα αφήνεται να κατακαθίσει και 10,0 ml του υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρονται με σιφόνιο σε ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται 5 ml ορθο-φωσφορικού οξέος (3.14). Το pH ρυθμίζεται στο 3 χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου (3.10). Προστίθεται ικανή ποσότητα μεθανόλης (3.8) ώστε να ληφθεί συγκέντρωση μεταξύ 10 και 30 % μεθανόλης στον τελικό όγκο. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη καταλλήλου όγκου και αραιώνεται με νερό στον όγκο που απαιτείται για τη χρωματογραφία [περίπου ο ίδιος όγκος με το πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)].

Μερικά ml του διαλύματος διηθούνται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm (4.5) πριν εγχυθούν στη στήλη HPLC. Ακολουθεί χρωματογράφιση σύμφωνα με την παράγραφο 5.4.

Το πρότυπο διάλυμα και τα εκχυλίσματα προστατεύονται από το άμεσο ηλιακό φως. Εάν δεν είναι δυνατή η ανάλυση των εκχυλισμάτων την ίδια ημέρα, τα εκχυλίσματα μπορούν να φυλαχθούν στους 5 $^{\circ}\text{C}$ για τρεις ημέρες το πολύ.

5.3. Προσδιορισμός της συνολικής θρυπτοφάνης (υδρόλυμα)

Στην πολυπροπυλενική φιάλη (4.4) ζυγίζονται με προσέγγιση 0,2 mg από 0,1 έως 1 g του παρασκευασθέντος δείγματος (5.1). Η ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε άζωτο περίπου 10 mg. Προστίθενται 8,4 g οκταένυδρο υδροξείδιο του βαρίου (3.4) και 10 ml νερό. Το σύνολο αναμειγνύεται σε αναμείκτη vortex (4.8) ή μαγνητικό αναδευτήρα (4.7). Ο επικαλυμμένος με τεφλόν μαγνήτης αφήνεται στο μείγμα. Τα τοιχώματα του δοχείου εκπλύνονται προς τα κάτω με 4 ml νερό. Τοποθετείται το βιδωτό πώμα και η φιάλη κλείνεται χαλαρά. Μεταφέρεται σε αυτόκλειστο (4.6) με βραστό νερό και ατμό για 30-60 λεπτά. Το αυτόκλειστο κλείνεται και ακολουθεί θέρμανση στους 110 ($\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ για 20 ώρες.

Πριν ανοιχθεί το αυτόκλειστο, η θερμοκρασία μειώνεται λίγο κάτω από τους 100 $^{\circ}\text{C}$. Για την αποφυγή κρυστάλλωσης του $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, προστίθενται στο θερμό μείγμα 30 ml νερό με θερμοκρασία δωματίου. Το σύνολο ανακινείται ή αναδεύεται ήπια. Προστίθενται 2,00 ml πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου (α-μεθυλο-θρυπτοφάνης) (3.16). Τα δοχεία ψύχονται σε λουτρό νερού/πάγου για 15 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθενται 5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.14). Το δοχείο διατηρείται στο λουτρό ψύξης και εξουδετερώνεται με HCl (3.11) με ταυτόχρονη ανάδευση και το pH ρυθμίζεται στο 3,0 με HCl (3.12). Προστίθεται ικανή ποσότητα μεθανόλης ώστε να ληφθεί συγκέντρωση μεταξύ 10 και 30 % μεθανόλης στον τελικό όγκο. Κατάλληλη ποσότητα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη και αραιώνεται με νερό στον καθορισμένο όγκο που απαιτείται για τη χρωματογραφία (π.χ. 100 ml). Η προσθήκη μεθανόλης δεν πρέπει να προκαλεί καθίζηση.

▼ B

Μερικά ml του διαλύματος διηθούνται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,45 μm (4.5) πριν εγχυθούν στη στήλη HPLC. Ακολουθεί χρωματογράφιση σύμφωνα με την παράγραφο 5.4.

Το πρότυπο διάλυμα και τα υδρόλυματα προστατεύονται από το άμεσο ηλιακό φως. Εάν δεν είναι εφικτή η ανάλυση των υδρόλυμάτων την ίδια ημέρα, τότε αυτά μπορούν να φυλαχθούν στους 5 °C για τρεις ημέρες το πολύ.

5.4. Προσδιορισμός με HPLC

Για ισοκρατική έκλυση κατάλληλες είναι οι ακόλουθες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες συνθήκες, υπό την προϋπόθεση ότι παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα (βλέπε επίσης τις παρατηρήσεις 9.1 και 9.2):

Υγρή χρωματογραφική στήλη (4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 3 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη
Θερμοκρασία στήλης:	θερμοκρασία δωματίου
Κινητή φάση (3.22):	3,00 g οξικό οξύ (3.18) + 900 ml νερό (3.1) + 50,0 ml διάλυμα (3.21) 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλης (3.19) σε μεθανόλη (3.8) (1g/100ml). Το pH ρυθμίζεται στο 5,00 με αιθανολαμίνη (3.20). Συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (3.1)
Ρυθμός ροής:	1 ml/min
Συνολικός χρόνος ροής:	περίπου 34 min
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	διέγερση: 280 nm, εκπομπή: 356 nm.
Όγκος έγχυσης	20 μl

6. Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Η ποσότητα της θρυπτοφάνης (X), σε g ανά 100 g δείγματος, υπολογίζεται ως εξής.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = εμβαδόν κορυφής εσωτερικού προτύπου, πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)

B = εμβαδόν κορυφής θρυπτοφάνης, εκχύλισμα (5.2) ή υδρόλυμα (5.3)

V₁ = όγκος σε ml (2 ml) πυκνού διαλύματος θρυπτοφάνης (3.15) που προστίθεται στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)

c = συγκέντρωση σε μmol/ml = 2,50 πυκνού διαλύματος θρυπτοφάνης (3.15) που προστίθεται στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)

V₂ = όγκος σε ml του πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.16) που προστίθεται στην εκχύλιση (5.2) = 5,00 ml ή στο υδρόλυμα (5.3) = 2,00 ml

C = εμβαδόν κορυφής εσωτερικού προτύπου, εκχύλισμα (5.2) ή υδρόλυμα (5.3)

D = εμβαδόν κορυφής θρυπτοφάνης, πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)

V₃ = όγκος σε ml (= 2,00 ml) πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.16) που προστίθεται στο πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης (3.17)

m = βάρος δείγματος σε g (διορθωμένο στο αρχικό βάρος εφόσον έχει ξηρανθεί ή/και απολιπανθεί)

M = μοριακό βάρος θρυπτοφάνης (= 204,23 g/mol)

7. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών που γίνονται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή.

▼ B

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή κοινοτική μελέτη (4η διασύγκριση) στην οποία τρία δείγματα αναλύθηκαν από μέχρι δώδεκα εργαστήρια για την πιστοποίηση της μεθόδου υδρόλυσης. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναληπτικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 Ζωοτροφή χοίρων	Δείγμα 2 Ζωοτροφή χοίρων με συμπλήρωμα L-θρυποφάνης	Δείγμα 3 Συμπύκνωμα ζωοτροφής για χοίρους
L	12	12	12
n	50	55	50
Μέσος όρος [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = αριθμός υποβληθέντων εργαστηριακών αποτελεσμάτων
 n = αριθμός μεμονωμένων αποτελεσμάτων που διατηρούνται απαλείφοντας τις ακραίες τιμές (προσδιορίζονται με τη δοκιμή ακραίων τιμών Cochran, Dixon)
 s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
 S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
 r = επαναληψιμότητα
 R = αναπαραγωγιμότητα
 CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας, %
 CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας, %

Πραγματοποιήθηκε μια άλλη κοινοτική μελέτη (3η διασύγκριση) στην οποία δύο δείγματα αναλύθηκαν από μέχρι δεκατρία εργαστήρια για την πιστοποίηση της μεθόδου υδρόλυσης. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναληπτικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 4 Μείγμα σίτου και σόγιας	Δείγμα 5 Μείγμα σίτου και σόγιας (= δείγμα 4) με προσθήκη θρυποφάνης (0,457g/kg)
L	12	12
n	55	60
Μέσος όρος [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = αριθμός υποβληθέντων εργαστηριακών αποτελεσμάτων
 n = αριθμός μεμονωμένων αποτελεσμάτων που διατηρούνται απαλείφοντας τις ακραίες τιμές (προσδιορίζονται με τη δοκιμή ακραίων τιμών Cochran, Dixon)
 s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
 S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
 r = επαναληψιμότητα
 R = αναπαραγωγιμότητα
 CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας, %
 CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας, %

▼B

Πραγματοποιήθηκε μια άλλη κοινοτική μελέτη διασύγκρισης στην οποία αναλύθηκαν τέσσερα δείγματα από μέχρι επτά εργαστήρια με σκοπό την πιστοποίηση θρυπτοφάνης για υδρόλυση. Τα αποτελέσματα δίνονται κατωτέρω. Σε κάθε δείγμα έγιναν πέντε επαναληπτικές αναλύσεις.

	Δείγμα 1 Αναμεμιγ- μένη ζωο- τροφή χοίρων (CRM 117)	Δείγμα 2 Ιχθυάλευρο με χαμηλά λιπαρά (CRM 118)	Δείγμα 3 Σογιάλευρο (CRM 119)	Δείγμα 4 Αποβουτυρω- μένο γάλα σε σκόνη (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Μέσος όρος [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

- L = αριθμός υποβληθέντων εργαστηριακών αποτελεσμάτων
n = αριθμός μεμονωμένων αποτελεσμάτων που διατηρούνται απα-
λείφοντας τις ακραίες τιμές (προσδιορίζονται με τη δοκιμή
ακραίων τιμών Cochran, Dixon)
S_R = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
s_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
r = επαναληψιμότητα
R = αναπαραγωγιμότητα
CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας, %
CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας, %

9. Παρατηρήσεις

- 9.1. Με ειδικές χρωματογραφικές συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ θρυπτοφάνης και α-μεθυλο-θρυπτοφάνης.

Ισοκρατική έκλουση που ακολουθείται από καθαρισμό της διαβαθμισμέ-
νης στήλης:

Υγρή χρωματογραφική στήλη:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη
Θερμοκρασία στήλης:	32 °C
Κινητή φάση:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /μεθανόλη, 95+5 (V+V). B: Μεθανόλη
Πρόγραμμα βαθμίδων:	0 min 100 % A 0 % B 15 min 100 % A 0 % B 17 min 60 % A 40 % B 19 min 60 % A 40 % B 21 min 100 % A 0 % B 33 min 100 % A 0 % B
Ρυθμός ροής:	1,2 ml/min
Συνολικός χρόνος ροής:	περίπου 33 λεπτά

- 9.2. Η χρωματογραφία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο HPLC και το χρησιμοποιούμενο υλικό πλήρωσης στήλης. Το επιλεγόμενο σύστημα πρέπει να μπορεί να επιτυγχάνει διαχωρισμό βασικής γραμμής μεταξύ θρυπτοφάνης και εσωτερικού προτύπου. Περαιτέρω, παίζει σημαντικό

▼B

ρόλο τα προϊόντα αποδόμησης να διαχωρίζονται σωστά από τη θρυπτοφάνη και το εσωτερικό πρότυπο. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υδρολύματα χωρίς εσωτερικό πρότυπο για να ελέγχεται η βασική γραμμή υπό το εσωτερικό πρότυπο για προσμείξεις. Παίζει σημαντικό ρόλο ο χρόνος λειτουργίας να είναι αρκετά μεγάλος για την έκλυση όλων των προϊόντων αποδόμησης, διαφορετικά στις επόμενες χρωματογραφικές δοκιμές μπορεί να παρεισφρύσουν όψιμες κορυφές έκλυσης.

Στην περιοχή εργασίας, το χρωματογραφικό σύστημα πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση. Η γραμμική απόκριση πρέπει να μετριέται με σταθερή (την κανονική) συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου και ποικίλες συγκεντρώσεις θρυπτοφάνης. Έχει σημασία το μέγεθος των κορυφών και της θρυπτοφάνης και του εσωτερικού προτύπου να είναι στα πλαίσια της γραμμικής περιοχής του συστήματος HPLC/φθορισμού. Εάν η (οι) κορυφή(-ές) ή της θρυπτοφάνης ή/και του εσωτερικού προτύπου είναι πολύ μικρή ή πολύ υψηλή, η ανάλυση πρέπει να επαναλαμβάνεται με άλλο μέγεθος δείγματος ή/και τελικό όγκο.

9.3. Υδροξείδιο του βαρίου

Με το χρόνο, το υδροξείδιο του βαρίου είναι πολύ δύσκολο να διαλυθεί. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται μη διαυγές διάλυμα για τον προσδιορισμό HPLC, πράγμα το οποίο μπορεί να δώσει χαμηλές τιμές για τη θρυπτοφάνη.

H. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΩΝ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος αποσκοπεί στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ακατέργαστα έλαια και λίπη των ζωοτροφών. Δεν καλύπτει την ανάλυση των ελαιούχων σπόρων και καρπών.

Η εφαρμογή μιας εκ των δύο κατωτέρω περιγραφόμενων διαδικασιών εξαρτάται από τη φύση και τη σύνθεση της ζωοτροφής και το σκοπό για τον οποίο πραγματοποιείται η ανάλυση.

1.1. Διαδικασία A — Μέσες εκχυλίζόμενες ακατέργαστες λιπαρές ουσίες

Εφαρμόζεται σε απλά υλικά φυτικής προέλευσης, με εξαίρεση εκείνα που εντάσσονται στο πεδίο εφαρμογής της διαδικασίας B.

1.2. Διαδικασία B — Ολικά ακατέργαστα έλαια και λίπη

Εφαρμόζεται σε απλά υλικά ζωικής προέλευσης, και σε όλες τις σύνθετες τροφές. Εφαρμόζεται σε όλα εκείνα τα υλικά από τα οποία δεν είναι δυνατόν να εκχυλίζονται πλήρως έλαια και λιπαρές ουσίες χωρίς προκαταρκτική υδρόλυση, π.χ. γλουτένες, ζύμη, πρωτεΐνες γεωμήλων, και προϊόντα που υποβάλλονται σε εξώθηση, νιφάδοποίηση και εν θερμώ κατεργασία.

1.3. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Σε κάθε περίπτωση κατά την οποία επιτυγχάνονται υψηλότερα αποτελέσματα με την εφαρμογή της διαδικασίας B έναντι αυτών της διαδικασίας A, ως ορθή τιμή γίνεται δεκτή η επιτυγχανόμενη διά της διαδικασίας B.

2. Αρχή

2.1. Διαδικασία A

Το δείγμα υδρολύεται με αιθέρα. Το διαλυτικό μέσο απομακρύνεται με απόσταξη και το υπόλειμμα ξηραίνεται και ζυγίζεται.

2.2. Διαδικασία B

Γίνεται επεξεργασία του δείγματος με υδροχλωρικό οξύ υπό θέρμανση. Το μείγμα ψύχεται και φιλτράρεται. Το υπόλειμμα ξηλώνεται και ξηραίνεται και προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο A.

▼ B**3. Αντιδραστήρια**

- 3.1. Αιθέρας, περιοχή ζέσεως: 40 μέχρι 60 °C. Ο δείκτης του βρωμίου πρέπει να είναι κατώτερος από 1 και το υπόλειμμα της εξάτμισης κατώτερο από 2 mg/100 ml.
- 3.2. Άνυδρο θειικό νάτριο.
- 3.3. Υδροχλωρικό οξύ, $c = 3 \text{ mol/l}$.
- 3.4. Επιβοηθητικό διήθησης, π.χ. γη διατόμων, Hyflo-supercel.

4. Όργανα

- 4.1. Συσκευή εκχύλισης. Εάν η συσκευή είναι εφοδιασμένη με σифόνιο (συσκευή Soxhlet), η παροχή αναρροής ρυθμίζεται προς επίτευξη 10 στροφών τουλάχιστον ανά ώρα. Εφόσον χρησιμοποιείται συσκευή άνευ σιφωνίων, η παροχή του αναρρεούμενου υγρού πρέπει να είναι 10 ml περίπου ανά λεπτό.
- 4.2. Φυσίγγια εκχύλισης, ελεύθερα διαλυτών στον αιθέρα ουσιών των οποίων το πορώδες ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις της παραγράφου 4.1.
- 4.3. Ξηραντήρας, είτε κενού σε $75 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, είτε με ατμοσφαιρική πίεση σε $100 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Διαδικασία**5.1. Διαδικασία Α (βλέπε παράγραφο 8.1)**

Ζυγίζονται 5 g δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, εισάγονται εντός φυσιγγίου εκχύλισης (4.2) και καλύπτονται με βαμβάκερο πάμα απαλλαγμένου λιπαρών ουσιών.

Τοποθετείται το φυσίγγιο εντός συσκευής εκχύλισης (4.1) και εκχυλίζεται επί 6 ώρες με αιθέρα (3.1). Συλλέγεται το εκχύλισμα εντός ξηράς φιάλης⁽¹⁾, εφοδιασμένης με μερικά τεμάχια κίσηρης, της οποίας έχει ληφθεί το απόβρο.

Απομακρύνεται το διαλυτικό μέσο με απόσταξη. Ξηραίνεται το υπόλειμμα επί μιάμιση ώρα τοποθετώντας τη φιάλη εντός ξηραντήρα (4.3). Ψύχεται εντός αποξηραντήρος και ζυγίζεται. Διενεργείται εκ νέου ξήρανση για 30 λεπτά προς επιβεβαίωση ότι το βάρος της λιπαράς ύλης παραμένει σταθερό (η απώλεια του βάρους μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγισμάτων πρέπει να είναι κατώτερη του 1 mg).

5.2. Διαδικασία Β

Ζυγίζονται 2,5 g δείγματος με προσέγγιση 1 ml (βλέπε παρατήρηση 8.2) και εισάγονται εντός γυάλινου ποτηριού ζέσεως των 400 ml ή εντός κωνικής φιάλης των 300 ml και προστίθενται 100 ml υδροχλωρικού οξέος 3M (3.3) και μερικά τεμάχια κίσηρης. Καλύπτεται το γυάλινο ποτήρι ζέσεως με γυαλί ωρολογίου ή εφοδιάζεται η κωνική φιάλη με κάθετο φυκτήρα. Το μείγμα φέρεται σε ήπιο βρασμό με τη χρήση χαμηλής φλόγας ή θερμαντικής πλάκας και διατηρείται εκεί για μία ώρα. Αποφεύγεται η προσκόλληση του προϊόντος επί των πλευρών του δοχείου.

Ψύχεται και προστίθεται ποσότητα επιβοηθητικού διήθησης (3.4), επαρκής προς αποφυγή κάθε απώλειας λιπαρής ύλης κατά τη διάρκεια της διήθησης. Διηθείται με διπλό υγρό διηθητικό χάρτη ελεύθερου λιπαρών υλών. Εκπλύνεται το υπόλειμμα με ψυχρό νερό μέχρι την ουδετεροποίηση του διηθήματος. Η παρουσία αυτών υποδεικνύει ότι το δείγμα πρέπει να εκχυλιστεί με αιθέρα, κατά τη διαδικασία Α, πριν από την υδρόλυση.

Τοποθετείται ο διπλός διηθητικός χάρτης ο οποίος περιέχει το υπόλειμμα σε γυαλί ωρολογίου και ξηραίνεται επί μιάμιση ώρα εντός κλιβάνου αποξήρανσης (4.3) σε θερμοκρασία $100 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

⁽¹⁾ Όταν η λιπαρή ύλη πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο μεταγενέστερων ποιοτικών εξετάσεων, τα τεμάχια κίσηρης αντικαθίστανται από γυάλινες χάντρες.

▼ B

Εισάγεται ο διπλός διηθητικός χάρτης και το ξηρό υπολείμμα εντός φυσιγγίου εκχύλισης (4.2) και καλύπτεται με βαμβακερό πόμα απαλλαγμένου λιπαρών ουσιών (4.1). Τοποθετείται το φυσιγγίο εντός συσκευής εκχύλισης και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1, δεύτερη και τρίτη υποπαράγραφος.

6. Διατύπωση των αποτελεσμάτων

Το αποτέλεσμα του ζυγίσματος εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλαπαράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών, επί του ίδιου δείγματος, από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

- το 0,2 %, σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε ακατέργαστα έλαια και λίπη μικρότερες του 5 %,
- το 4,0 %, του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητα από 5 έως 10 %,
- το 0,4 %, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεγαλύτερες του 10 %.

8. Παρατηρήσεις

- 8.1. Για τα προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα λιπαρών ουσιών, δύσκολα κονιοποιούμενα ή μη κατάλληλα για λήψη μειωμένης και ομοιογενούς ποσότητας.

Ζυγίζονται 20 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg και αναμειγνύονται με ποσότητα 10 g ή περισσότερων άνδρου θειικού νατρίου (3.2). Διενεργείται εκχύλιση με αιθέρα (3.1) όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1. Το επιτευχθέν εκχύλισμα συμπληρώνεται έως 500 ml με αιθέρα (3.1) και αναμειγνύεται. Εισάγονται 50 ml του διαλύματος σε μικρή ξηρή φιάλη εφοδιασμένη με μερικά τεμάχια κίσηρης της οποίας έχει ληφθεί το απόβαρο. Απομακρύνεται το διαλυτικό μέσο με απόσταξη, ξηραίνεται και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1 τελευταία υποπαράγραφος.

Απομακρύνεται το διαλυτικό μέσο του υπολείμματος της εκχύλισης, το οποίο βρίσκεται εντός του φυσιγγίου, κονιοποιείται το υπόλοιπο σε κόκκους 1 mm, τοποθετείται εκ νέου εντός φυσιγγίου (άνευ προσθήκης θειικού νατρίου) και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1 δεύτερη και τρίτη υποπαράγραφος.

Η περιεκτικότητα σε ακατέργαστες λιπαρές ύλες σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος εκφράζεται με τον τύπο:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

όπου:

- m_1 = βάρος σε γραμμάρια του υπολείμματος της πρώτης εκχύλισης (χρησιμοποιηθέν μέρος του εκχυλίσματος),
 m_2 = βάρος σε γραμμάρια του υπολείμματος του δεύτερου εκχυλίσματος.

- 8.2. Η ποσότητα του δείγματος των χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρές ύλες προϊόντων μπορεί να ανέρχεται σε 5 g.
- 8.3. Τροφές ζώων συντροφιάς υψηλής περιεκτικότητας σε νερό πρέπει να αναμειγνύονται με άνδρο θειικό νάτριο πριν από την υδρόλυση και την εκχύλιση σύμφωνα με τη διαδικασία Β.
- 8.4. Στην παράγραφο 5.2, ενδέχεται να είναι αποτελεσματικότερη η χρήση θερμού νερού, αντί του ψυχρού, για την έκπλυση του υπολείμματος μετά τη διήθηση.
- 8.5. Ο χρόνος ξήρανσης της μιάμισης ώρας είναι πιθανόν να πρέπει να παραταθεί για ορισμένες ζωοτροφές. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική ξήρανση, καθώς οδηγεί σε χαμηλές τιμές αποτελεσμάτων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί φούρνος μικροκυμάτων.

▼B

- 8.6. Αν η περιεκτικότητα σε ακατέργαστα έλαια και λίπη υπερβαίνει το 15 %, συνιστάται, πριν από την υδρόλυση και εκχύλιση της διαδικασίας B, η προεκχύλιση σύμφωνα με τη διαδικασία A. Αυτό εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τη φύση της ζωοτροφής και τη φύση των ελαίων/λιπών που περιέχονται στις ζωοτροφές.

Θ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΝΩΔΩΝ ΟΥΣΙΩΝ**1. Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των εντός των ζωοτροφών οργανικών υλών, των ελεύθερων λιπών και αδιάλυτων σε όξινα ή αλκαλικά μέσα, που συμβατικά ονομάζονται ινώδεις ουσίες.

2. Αρχή

Το δείγμα, ενδεχομένως απολιπανθέν, υποβάλλεται σε κατεργασία διαδοχικά με ζέοντα διαλύματα θειικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου καθορισμένης συγκέντρωσης. Το υπόλειμμα διαχωρίζεται με διήθηση σε ηθμό από συντηγμένο γυαλί αμιάντου, εκπλύνεται, ξηραίνεται, ζυγίζεται και αποτεφρώνεται σε θερμοκρασιακό εύρος 475 έως 500 °C. Η απώλεια βάρους που προκύπτει από την αποτέφρωση αντιστοιχεί στις ινώδεις ουσίες του δείγματος.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Θειικό οξύ, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Αντιαφριστικό γαλάκτωμα (π.χ. n-οκτανόλη).
- 3.3. Διηθητικό μέσο (Celite 545 ή ισοδύναμο), θερμαινόμενο στους 500 °C για τέσσερις ώρες (8.6).
- 3.4. Καθαρή ακετόνη.
- 3.5. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40 έως 60 °C.
- 3.6. Υδροχλωρικό οξύ, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Όργανα

- 4.1. Θερμαντική μονάδα για την ανοργανοποίηση με θειικό οξύ και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, η οποία διαθέτει στήριγμα για το γυάλινο χωνευτήριο (4.2) και σωλήνα εκροής με στρόφιγγα στην έξοδο των υγρών και κενού, ενδεχομένως με συμπιεσμένο αέρα. Κάθε μέρα, πριν από τη χρήση, η μονάδα προθερμαίνεται με βραστό νερό για πέντε λεπτά.
- 4.2. Γυάλινο χωνευτήριο με διηθητική πλάκα από συντηγμένο γυαλί με πόρους μεγέθους 40-90 μm . Πριν από την πρώτη χρήση, θερμαίνεται στους 500 °C για λίγα λεπτά και αφήνεται να ψυχθεί (8.6).
- 4.3. Κύλινδρος χωρητικότητας τουλάχιστον 270 ml με κάθετο ψυκτήρα, κατάλληλος για βρασμό.
- 4.4. Κλίβανος αποξήρανσης με θερμοστάτη.
- 4.5. Ηλεκτρικός κλίβανος με θερμοστάτη.
- 4.6. Μονάδα εκχύλισης που αποτελείται από πλάκα στήριξης για το γυάλινο χωνευτήριο (4.2.) και από σωλήνα εκροής με στρόφιγγα στην έξοδο κενού και υγρών.
- 4.7. Συνδετικοί δακτύλιοι για τη συναρμολόγηση της θερμαντικής μονάδας (4.1), του χωνευτηρίου (4.2) και του κυλίνδρου (4.3), καθώς και για τη σύνδεση της μονάδας εκχύλισης εν ψυχρώ (4.6) και του χωνευτηρίου.

5. Διαδικασία

Ζυγίζεται 1 g του παρασκευασθέντος δείγματος με προσέγγιση 1 mg και τοποθετείται μέσα στο χωνευτήριο (4.2), (βλέπε παρατηρήσεις 8.1, 8.2 και 8.3). Προστίθεται 1 g διηθητικού μέσου (3.3).

▼B

Συναρμολογείται η θερμαντική μονάδα (4.1) και το γυάλινο χωνευτήριο (4.2), στη συνέχεια ο κύλινδρος (4.3) συνδέεται με το χωνευτήριο. Προστίθενται 150 ml του ζέοντος θειικού οξέος (3.1) στο συναρμολογημένο κύλινδρο και χωνευτήριο και, αν χρειάζεται, προστίθενται λίγες σταγόνες αντιαφριτικού γαλακτώματος (3.2).

Το υγρό θερμαίνεται μέχρι του σημείου βρασμού εντός 5 ± 2 λεπτών και υποβάλλεται σε έντονο βρασμό για ακριβώς 30 λεπτά.

Ανοίγεται η στρόφιγγα του σωλήνα εκροής (4.1) και, υπό κενό, διηθείται το θειικό οξύ μέσω του γυάλινου χωνευτηρίου. Τα κατάλοιπα εκπλένονται τρεις φορές με 30 ml ζέοντος νερού κάθε φορά, φροντίζοντας για την ξηρή διήθηση των καταλοίπων μετά από κάθε έκπλυση.

Κλείνεται η στρόφιγγα εκροής και μεταγγίζονται 150 ml ζέοντος διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (3.7) στο συναρμολογημένο κύλινδρο και χωνευτήριο. Προστίθενται λίγες σταγόνες αντιαφριτικού γαλακτώματος (3.2). Το υγρό θερμαίνεται μέχρι του σημείου βρασμού εντός 5 ± 2 λεπτών και υποβάλλεται σε έντονο βρασμό για ακριβώς 30 λεπτά. Ακολουθεί διήθηση και επαναλαμβάνεται η διαδικασία έκπλυσης που χρησιμοποιείται στη διαδικασία του θειικού οξέος.

Μετά την τελική έκπλυση και ξήρανση, αποσυνδέεται το χωνευτήριο και το περιεχόμενό του και επανασυνδέεται στη μονάδα εκχύλισης εν ψυχρώ (4.6). Τα κατάλοιπα εκπλένονται, υπό κενό, μέσα στο χωνευτήριο τρεις φορές με 25 ml ακετόνης κάθε φορά (3.4), φροντίζοντας για την ξηρή διήθηση των καταλοίπων μετά από κάθε έκπλυση.

Το χωνευτήριο ξηραίνεται στον κλίβανο αποξήρανσης στους 130 °C μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος του. Μετά από κάθε ξήρανση, αφήνεται να ψυχθεί μέσα στον ξηραντήρα και ζυγίζεται ταχέως. Το χωνευτήριο τοποθετείται μέσα στον ηλεκτρικό κλίβανο και αποτεφρώνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος του (η απώλεια βάρους μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση των 2 mg) στους 475 °C έως 500 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.

Μετά από κάθε θέρμανση, αφήνεται να ψυχθεί πρώτα μέσα στον κλίβανο και μετά μέσα στον ξηραντήρα πριν από το ζύγισμα.

Διενεργείται ένα τυφλό πείραμα χωρίς το δείγμα. Η απώλεια βάρους κατά την αποτέφρωση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 4 mg.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε ιώδεις ουσίες σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος δίδεται από τον τύπο:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

όπου:

m = βάρος δείγματος σε g,

m_0 = απώλεια βάρους κατά την αποτέφρωση, κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού, σε g,

m_1 = απώλεια βάρους κατά την αποτέφρωση, κατά τη διάρκεια του τυφλού πειράματος, σε g.

7. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών που έγιναν στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το:

— 0,6 % σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητα σε ιώδεις ουσίες μικρότερη του 10 %,

— 6 % σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητα σε ιώδεις ουσίες ίση ή υψηλότερη του 10 %.

8. Παρατηρήσεις

- 8.1. Οι ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο του 10 % λιπαρές ουσίες πρέπει να απολπιούνται πριν από την ανάλυση με πετρελαϊκό αιθέρα (3.5). Το χωνευτήριο (4.2) με το περιεχόμενό του συνδέεται με τη μονάδα εκχύλισης εν ψυχρώ (4.6). Υπό κενό, τα κατάλοιπα εκπλένονται

▼B

τρεις φορές με 30 ml πετρελαϊκού αιθέρα κάθε φορά, φροντίζοντας για την ξήρανση των καταλοίπων. Το χωνευτήριο και το περιεχόμενό του συνδέεται με τη θερμαντική μονάδα (4.1) και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.

- 8.2. Οι ζωοτροφές που περιέχουν λίπη τα οποία δεν μπορούν να προκύψουν με απευθείας εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (3.5) πρέπει να απολιπαίνονται όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 8.1 και να απολιπαίνονται εκ νέου μετά το βρασμό με οξύ. Μετά το βρασμό με οξύ και την έκπλυση, το χωνευτήριο και το περιεχόμενό του συνδέεται με τη μονάδα εκχύλισης εν ψυχρώ (4.6) και εκπλένεται τρεις φορές με 30 ml ακετόνης κάθε φορά, και στη συνέχεια τρεις φορές με 30 ml πετρελαϊκού αιθέρα κάθε φορά. Το προϊόν διηθείται υπό κενό μέχρις ότου αποξηρανθεί και η ανάλυση συνεχίζεται όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5, ξεκινώντας με την κατεργασία με υδροξείδιο του καλίου.
- 8.3. Αν η ζωοτροφή περιέχει πάνω από 5 % ανθρακικά άλατα καλίου, το χωνευτήριο (4.2) με το ζυγισμένο δείγμα συνδέεται με τη θερμαντική μονάδα (4.1). Το δείγμα επλένεται τρεις φορές με 30 ml υδροχλωρικού οξέος κάθε φορά (3.6). Μετά από κάθε προσθήκη οξέος, το δείγμα αφήνεται για ένα λεπτό περίπου πριν από τη διήθηση. Το δείγμα εκπλένεται μία φορά με 30 ml νερού και η διαδικασία συνεχίζεται όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.
- 8.4. Αν χρησιμοποιείται συσκευή με τη μορφή βάσης (περισσότερα από ένα χωνευτήρια προσαρτημένα στην ίδια θερμαντική μονάδα), δεν επιτρέπεται η διενέργεια δύο μεμονωμένων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα ανάλυσης στην ίδια σειρά.
- 8.5. Αν, μετά το βρασμό, η διήθηση των όξινων και βασικών διαλυμάτων είναι δυσχερής, διοχετεύεται συμπιεσμένος αέρας μέσω του σωλήνα εκροής της θερμαντικής μονάδας και στη συνέχεια συνεχίζεται η διήθηση.
- 8.6. Η θερμοκρασία αποτέφρωσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 500 °C, προκειμένου να παρατείνεται η διάρκεια ζωής του γυάλινου χωνευτηρίου. Χρειάζεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η υπερβολική θερμική καταπόνηση στη διάρκεια των κύκλων θέρμανσης και ψύξης.

I. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων και των ολικών σακχάρων έπειτα από ιμβερτοποίηση, εκφρασμένων σε γλυκόζη ή, κατά περίπτωση, σε σακχαρόζη, με συντελεστή μετατροπής 0,95. Εφαρμόζεται στις σύνθετες ζωοτροφές. Ιδιαίτερες διαδικασίες προβλέπονται για άλλες ζωοτροφές. Σε μερικές περιπτώσεις χρειάζεται να προσδιορισθεί ξεχωριστά η λακτόζη και να λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

2. Αρχή

Τα σάκχαρα διαλύονται σε αραιή αιθανόλη- το διάλυμα αποστραγγίζεται με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων Carrez I και II. Έπειτα από απομάκρυνση της αιθανόλης, οι προσδιορισμοί πραγματοποιούνται πριν και μετά από ιμβερτοποίηση, κατά τη μέθοδο Luff-Schoorl.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Διάλυμα αιθανόλης 40 % (κατ' όγκο) πυκνότητας: 0,948 g/ml σε θερμοκρασία 20 °C και στο σημείο αλλαγής της φαινολοφθαλείνης.
- 3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύστε σε νερό 21,9 g οξικού ψευδαργύρου Zn (CH₃COO)₂ 2H₂O και 3 g κρυσταλλικού οξικού οξέος. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.
- 3.3. Διάλυμα Carrez II: Διαλύστε σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου K₄Fe (CN)₆ 3H₂O. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.
- 3.4. Διάλυμα 0,1 % (βάρος/όγκο) πορτοκαλόχρου του μεθυλίου.
- 3.5. Υδροχλωρικό οξύ 4 mol/l.
- 3.6. Υδροχλωρικό οξύ 0,1 mol/l.

▼B

- 3.7. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,1 mol/l.
- 3.8. Αντιδραστήριο κατά Luff-Schoorl:
- Ανακινώντας προσεκτικά, μεταγγίστε το διάλυμα του κιτρικού οξέος (3.8.2) στο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (3.8.3). Κατόπιν προσθέστε το διάλυμα του θειικού χαλκού (3.8.1) και συμπληρώστε στο 1 l με νερό. Αφήστε σε ηρεμία μία νύχτα και διηθήστε.
- Ελέγξτε τη συγκέντρωση του ληφθέντος αντιδραστηρίου (Cu 0,05 mol/l, Na₂ CO₃ 1 mol/l), βλέπε (5.4) τελευταία παράγραφος. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 9,4 περίπου.
- 3.8.1. Διάλυμα θειικού χαλκού: Διαλύστε 25 g θειικού χαλκού, Cu SO₄ 5H₂O, ελεύθερου σιδήρου, σε 100 ml νερό.
- 3.8.2. Διάλυμα κιτρικού οξέος: Διαλύστε 50 g κιτρικού οξέος, C₆H₈O₇ H₂O σε 50 ml νερό.
- 3.8.3. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου: Διαλύστε 143,8 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 300 ml περίπου θερμού νερού. Αφήστε να ψυχθεί.
- 3.9. Διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/l.
- 3.10. Διάλυμα αμύλου: Προσθέστε μείγμα 5 g διαλυτού αμύλου και 30 ml νερού σε 1 l ζέοντος νερού: Ζέετε επί 3 λεπτά, αφήνετε προς ψύξη και, ενδεχομένως, προσθέτετε 10 mg ιωδιούχο υδράργυρο ως συντηρητικό.
- 3.11. Θεικό οξύ 3 mol/l.
- 3.12. Διάλυμα 30 % (κ.ο.) ιωδιούχου καλίου.
- 3.13. Τεμάχια ελαφρόπετρας κατεργασμένα με βρασμό μέσα σε υδροχλωρικό οξύ, πλυμένα με νερό και στεγνωμένα.
- 3.14. Ισοπεντανόλη.
4. **Όργανα**
- Αναμείκτης (παλινδρομητής): περίπου 35 έως 40 παλινδρομήσεις στο λεπτό.
5. **Διαδικασία**
- 5.1. *Εκχύλιση δείγματος*
- Ζυγίστε 2,5 g δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, και τοποθετήστε τα μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Προσθέστε 200 ml αιθανόλης (3.1) και αναμείξτε επί μία ώρα στον παλινδρομητή. Προσθέστε 5 ml διαλύματος Carrez I (3.2) και ανακινήστε επί περίπου 30 δευτερόλεπτα. Προσθέστε κατόπιν 5 ml διαλύματος Carrez II (3.3) και ανακινήστε πάλι επί ένα λεπτό. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη (3.1), ομογενοποιήστε και διηθήστε. Αφαιρέστε 200 ml από το διήθημα και εξατμίστε περίπου στο μισό όγκο, προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της αιθανόλης. Μεταφέρετε ποσοτικά το υπόλειμμα της εξατμίσεως με τη βοήθεια θερμού νερού, σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml, ψύξτε, γεμίστε με νερό μέχρι τη χαραγή, ομογενοποιήστε και διηθήστε αν χρειάζεται. Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων και, έπειτα από ιμβερτοποίηση, τον προσδιορισμό των ολικών σακχάρων.
- 5.2. *Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων*
- Αφαιρέστε με σιφόνιο μία ποσότητα από το διάλυμα που δεν υπερβαίνει τα 25 ml και περιέχει λιγότερο από 60 mg ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό απεσταγμένο και προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα κατά Luff-Schoorl. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γλυκόζη επί τοις εκατό.
- 5.3. *Προσδιορισμός των ολικών σακχάρων μετά από ιμβερτοποίηση*
- Αφαιρέστε με σιφόνιο 50 ml διαλύματος και τοποθετήστε τα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προσθέστε μερικές σταγόνες διαλύματος πορτοκαλόχρου του μεθυλίου (3.4) κατόπιν, προσεκτικά και ανακινώντας, υδροχλωρικό οξύ (3.5) μέχρι σαφούς αλλαγής στο κόκκινο. Προσθέστε 15 ml υδροχλωρικού οξέος (3.6), βυθίστε την φιάλη σε εντόνως ζέον υδατόλουτρο και αφήστε την εκεί επί 30 λεπτά. Ψύξτε ταχέως στους 20 °C περίπου και προσθέστε 15 ml διαλύματος υδροξειδίου

▼B

του νατρίου (3.7). Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό και ομογενοποιήστε. Αφαιρέστε μια ποσότητα που δεν υπερβαίνει τα 25 ml και περιέχει λιγότερο από 60 mg ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό απεσταγμένο και προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα κατά Luff-Schoorl. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό γλυκόζης ή, όπου χρειάζεται, σε σακχαρόζη κατόπιν πολλαπλασιασμού με τον συντελεστή 0,95.

5.4. Ογκομέτρηση κατά Luff-Schoorl

Αφαιρέστε με σιφόνιο 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (3.8) και τοποθετήστε τα σε κωνική φιάλη των 300 ml. Προσθέστε 25 ml, επακριβώς μετρηθέντα, του στραγγισμένου διαλύματος των σακχάρων. Προσθέστε δύο τεμάχια ελαφρόπετρας (3.13), θερμάνετε, ανακινώντας με το χέρι, επάνω από ελεύθερη φλόγα μέσου ύψους και φέρτε το υγρό σε βρασμό σε δύο λεπτά περίπου. Τοποθετήστε αμέσως την κωνική φιάλη πάνω σε μεταλλικό πλέγμα εφοδιασμένο με οθόνη αμιάντου και οπή διαμέτρου περίπου 6 cm, κάτω από την οποία έχει αναφθεί φλόγα. Η φλόγα είναι ρυθμισμένη κατά τρόπο ώστε μόνο ο πυθμένας της φιάλης να θερμαίνεται. Προσαρμόστε κατόπιν έναν ψυκτήρα επαναφοράς στην κωνική φιάλη. Από τη στιγμή αυτή ζέει επί 10 λεπτά ακριβώς. Ψύξτε αμέσως σε ψυχρό νερό και, μετά από 5 λεπτά περίπου, ογκομετρήστε ως ακολούθως:

Προσθέστε 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.12) και, αμέσως μετά και με προσοχή (λόγω κινδύνου σχηματισμού μεγάλης ποσότητας αφρού), 25 ml θειικού οξέος (3.11). Ογκομετρήστε κατόπιν με το διάλυμα θειοκυανιούχου νατρίου (3.9) μέχρι να εμφανισθεί ελαφρώς κιτρίνη χροιά, προσθέστε τον δείκτη αμύλου (3.10) και ολοκληρώστε την ογκομέτρηση.

Πραγματοποιήστε την ίδια ογκομέτρηση σε ένα μείγμα επακριβώς μετρηθέν από 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (3.8) και 25 ml νερού, αφού προσθέσετε 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.12) και 25 ml θειικού οξέος (3.11), χωρίς να φέρετε σε βρασμό.

6. Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Υπολογίστε με τη βοήθεια του πίνακα την ποσότητα της γλυκόζης σε mg που αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ των τιμών των δύο ογκομετρήσεων, εκφρασμένων σε ml θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/litre. Εκφράστε το αποτέλεσμα ως ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. Ιδιαίτεροι τρόποι εργασίας

- 7.1. Για ζωοτροφές πολύ πλούσιες σε μελάσσα και άλλες μη ιδιαίτερης ομοιογένειας, ζυγίστε 20 g και τοποθετήστε τα σε ογκομετρική φιάλη του 1 l με 500 ml νερό. Αναμείξτε επί μία ώρα στον παλινδρομητή. Αποστραγγίστε με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων Carrez I (3.2) και II (3.3) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.1 χρησιμοποιώντας όμως μια ποσότητα 4 φορές υψηλότερη για κάθε αντιδραστήριο. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη (κατ' όγκο).

Ομογενοποιήστε και διηθήστε. Απομακρύνετε την αιθανόλη όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.1. Επί απουσίας δεξτρινποιημένου αμύλου, συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό.

- 7.2. Για τις μελάσσες και τις πρώτες ύλες ζωοτροφών οι οποίες είναι πλούσιες σε σάκχαρα και πρακτικά απαλλαγμένες αμύλου (χαρούπια, ξηρά υπολείμματα τεύλων κ.ά.) ζυγίστε 5 g, τοποθετήστε τα σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml, προσθέστε 200 ml νερού απεσταγμένου και αναμείξτε επί μία ώρα ή περισσότερο, αν χρειάζεται, στον παλινδρομητή. Αποστραγγίστε κατόπιν με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων Carrez I (3.2) και II (3.3) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.1. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με ψυχρό νερό, ομογενοποιήστε και διηθήστε. Για τον προσδιορισμό των ολικών σακχάρων ακολουθήστε τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.

8. Παρατηρήσεις

- 8.1. Συνιστάται να προστεθεί περίπου 1 ml ισοπεντανόλης (3.14) (χωρίς να ληφθεί υπόψη ο όγκος), πριν το βρασμό με το αντιδραστήριο Luff-Schoorl, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.

▼B

- 8.2. Η διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας σε ολικά σάκχαρα μετά την ιμβερτοποιήση, εκφρασμένα σε γλυκόζη, και της περιεκτικότητας σε ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη, πολλαπλασιασμένη επί 0,95, δίνει την περιεκτικότητα σε σακχαρόζη επί τοις εκατό.
- 8.3. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ανάγοντα σάκχαρα, με εξαίρεση τη λακτόζη, δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν:
- 8.3.1. Για έναν κατά προσέγγιση υπολογισμό, πολλαπλασιάζουμε επί 0,675 την περιεκτικότητα σε λακτόζη προσδιορισμένη με ξεχωριστό προσδιορισμό και αφαιρούμε το αποτέλεσμα από την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα.
- 8.3.2. Για έναν ακριβή υπολογισμό των αναγόντων σακχάρων, με εξαίρεση τη λακτόζη, είναι απαραίτητο να ξεκινήσουμε από την ίδια ποσότητα δοκιμής για τους δύο τελικούς προσδιορισμούς. Η μία από τις αναλύσεις πραγματοποιείται επί ενός τμήματος του διαλύματος που λαμβάνεται σύμφωνα με την παράγραφο 5.1, η άλλη επί ενός τμήματος του διαλύματος που λαμβάνεται κατά τον προσδιορισμό της λακτόζης σύμφωνα με τη μέθοδο που προβλέπεται για το σκοπό αυτό (έπειτα από ζύμωση των άλλων ειδών σακχάρων και αποστράγγιση).

Και στις δύο περιπτώσεις, η ποσότητα του υπάρχοντος σακχάρου προσδιορίζεται σύμφωνα με την μέθοδο Luff-Schoorl και υπολογίζεται σε mg γλυκόζης. Οι δύο τιμές αφαιρούνται η μία από την άλλη και η διαφορά εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

Παράδειγμα

Οι δύο ληφθέντες όγκοι αντιστοιχούν για κάθε προσδιορισμό, σε ποσότητα δοκιμής 250 mg.

Στην πρώτη περίπτωση, καταναλώνονται 17 ml διαλύματος θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/litre πράγμα που αντιστοιχεί σε 44,2 mg γλυκόζης, στη δεύτερη περίπτωση 11 ml, πράγμα που αντιστοιχεί σε 27,6 mg γλυκόζης.

Η διαφορά συνίσταται σε 16,6 mg γλυκόζης.

Η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα (με εξαίρεση τη λακτόζη), υπολογισμένη σε γλυκόζη, είναι επομένως:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Πίνακας τιμών για 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff Schoorl

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litre, δύο λεπτά θέρμανση, 10 λεπτά βρασμός

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ litre	Γλυκόζη, φρουκτόζη ιμβερτοποιημένα σάκχαρα C ₆ H ₁₂ O ₆		Λακτόζη C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Μαλτόζη C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ litre
ml	mg	διαφορά	mg	διαφορά	mg	διαφορά	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	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	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼ B**ΙΑ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ****1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λακτόζη ζωοτροφών που περιέχουν περισσότερο από 0,5 % λακτόζης.

2. Αρχή

Τα σάκχαρα διαλύονται σε νερό. Το διάλυμα υποβάλλεται σε ζύμωση με μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* οι οποίοι αφήνουν τη λακτόζη απρόσβλητη. Έπειτα από αποστράγγιση και διήθηση, η περιεκτικότητα σε λακτόζη του διηθήματος προσδιορίζεται με τη μέθοδο Luff-Schoorl.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Αιώρημα μυκήτων *Saccharomyces cerevisiae*: δημιουργήστε εναιώρημα 25 g νοπής μαγιάς σε 100 ml νερού. Το εναιώρημα διατηρείται το πολύ μία εβδομάδα σε ψυγείο.

3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύστε στο νερό 21,9 g οξικού ψευδαργύρου Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O και 3 g κρυσταλλικού οξικού οξέος. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.

3.3. Διάλυμα Carrez II: Διαλύστε στο νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου K₄Fe (CN)₆ 3H₂O. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.

3.4. Αντιδραστήριο κατά Luff-Schoorl:

Ανακινώντας προσεκτικά, μεταγγίστε το διάλυμα του κιτρικού οξέος (3.4.2) στο διάλυμα του ανθρακικού νατρίου (3.4.3). Προσθέστε στη συνέχεια το διάλυμα του θειικού χαλκού (3.4.1) και συμπληρώστε στο 1 l με νερό. Αφήστε σε ηρεμία μια νύκτα και διηθήστε. Ελέγξτε την καυστικότητα του ληφθέντος διαλύματος (Cu 0,05 mol/litre· Na₂ CO₃ 1 mol/litre). Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 9,4 περίπου.

3.4.1. Διάλυμα θειικού χαλκού: Διαλύστε 25 g θειικού χαλκού Cu SO₄ 5H₂O, ελεύθερου σιδήρου, σε 100 ml νερό.

3.4.2. Διάλυμα κιτρικού οξέος: Διαλύστε 50 g κιτρικού οξέος C₆H₈O₇ H₂O σε 50 ml νερού.

3.4.3. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου: Διαλύστε 143,8 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου σε 300 ml περίπου θερμού νερού. Αφήστε να ψυχθεί.

3.5. Κόκκοι ελαφρόπετρας κατεργασμένοι με βρασμό σε υδροχλωρικό οξύ, πλυμένοι και ξηραμένοι.

3.6. Διάλυμα 30 % (βάρους/όγκο) ιωδιούχου καλίου.

3.7. Θειικό οξύ 3 mol/litre.

3.8. Διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/litre.

3.9. Διάλυμα αμύλου: Προσθέστε ένα μείγμα από 5 g διαλυτού αμύλου και 30 ml νερού σε 1 l ζέοντος νερού. Ζέει επί 3 λεπτά, αφήνεται να ψυχθεί και, ενδεχομένως, προστίθενται 10 mg ιωδιούχου υδραργύρου ως συντηρητικού.

4. Όργανα

Υδατόλουτρο εφοδιασμένο με θερμοστάτη ρυθμισμένο στους 38 έως 40 °C.

5. Διαδικασία

Ζυγίστε 1 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg και τοποθετήστε αυτή την ποσότητα δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, προσθέστε 25 έως 30 ml νερού. Τοποθετήστε τη φιάλη επί τριάντα λεπτά σε ζέον υδρόλουτρο και ψύξτε κατόπιν στους 35 °C περίπου. Προσθέστε 5 ml εναιωρήματος μαγιάς (3.1) και ομογενοποιήστε. Αφήστε τη φιάλη σε ηρεμία επί δύο ώρες μέσα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 38 έως 40 °C. Ψύξτε κατόπιν μέχρι 20 °C περίπου.

Προσθέστε 2,5 ml διαλύματος Carrez I (3.2) και ανακινήστε επί τριάντα δευτερόλεπτα, προσθέστε κατόπιν 2,5 ml διαλύματος Carrez II (3.3) και ανακινήστε εκ νέου, επί τριάντα δευτερόλεπτα. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό, αναμείξτε και διηθήστε. Αφαιρέστε με σιφόνιο μία

▼B

ποσότητα διηθήματος όχι μεγαλύτερη από 25 ml η οποία περιέχει κατά προτίμηση 40 έως 80 mg λακτόζης και τοποθετήστε την σε κωνική φιάλη των 300 ml. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό.

Προβείτε κατά τον ίδιο τρόπο σε τυφλό πείραμα με 5 ml εναιωρήματος μαγιάς (3.1). Προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε λακτόζη κατά Luff-Schoorl ως ακολούθως: Προσθέστε 25 ml ακριβώς αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (3.4) και δύο τεμάχια ελαφρόπετρας (3.5). Θερμάνετε ανακινώντας με το χέρι, πάνω από ελεύθερη φλόγα μέσου ύψους και φέρτε το υγρό σε βρασμό εντός δύο λεπτών περίπου. Τοποθετήστε αμέσως την κωνική φιάλη πάνω σε μεταλλικό πλέγμα εφοδιασμένο με οθόνη αμιάντου και οπή διαμέτρου περίπου 6 cm, κάτω από το οποίο έχει αναφθεί προηγουμένως φλόγα. Η φλόγα ρυθμίζεται έτσι ώστε να θερμαίνεται μόνο ο πυθμένας της φιάλης. Προσαρμόστε κατόπιν έναν ψυκτήρα επαναφοράς στην κωνική φιάλη. Από το σημείο αυτό ζέετε επί 10 λεπτά ακριβώς. Ψύξτε αμέσως σε ψυχρό νερό και μετά από 5 λεπτά περίπου, τιτλοδοτήστε ως ακολούθως:

Προσθέστε 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.6) και, αμέσως μετά και με προσοχή (λόγω κινδύνου σχηματισμού μεγάλης ποσότητας αφρού), 25 ml θειικού οξέος (3.7). Τιτλοδοτήστε κατόπιν με το διάλυμα του θειοθειικού νατρίου (3.8) μέχρι να εμφανιστεί ελαφρώς κίτρινος χρωματισμός, προσθέστε τον δείκτη αμύλου (3.9) και ολοκληρώστε την τιτλοδότηση.

Πραγματοποιήστε την ίδια τιτλοδότηση σε επακριβώς μετρηθέν μείγμα από 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (3.4) και 25 ml νερού, αφού έχετε προσθέσει 10 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (3.6) και 25 ml θειικού οξέος (3.7), χωρίς να φέρετε σε βρασμό.

6. Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Υπολογίστε με τη βοήθεια του πίνακα την ποσότητα της λακτόζης σε mg που αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο τιτλοδοτήσεων, εκφράστε σε ml θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/litre.

Εκφράστε το αποτέλεσμα της άνυδρης λακτόζης σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. Παρατήρηση

Για τα προϊόντα που περιέχουν περισσότερο από 40 % ζυμώσιμα σάκχαρα χρησιμοποιήστε περισσότερο από 5 ml εναιωρήματος μαγιάς (3.1).

Πίνακας τιμών για 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litre, δύο λεπτά θέρμανση, δέκα λεπτά βρασμός

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ litre	Γλυκόζη, φρουκτόζη ιμπερτοποιημένα σάκχαρα C ₆ H ₁₂ O ₆		Λακτόζη C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Μαλτόζη C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ litre
ml	mg	διαφορά	mg	διαφορά	mg	διαφορά	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	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	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼B

IB. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΟΥ

ΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο και σε προϊόντα διάσπασης των υψηλών μοριακών βαρών αμύλου των ζωοτροφών με στόχο τον έλεγχο συμμόρφωσης προς τη δηλούμενη ενεργειακή αξία (βλέπε διατάξεις του παραρτήματος VII) και προς την οδηγία 96/25/EK του Συμβουλίου⁽¹⁾.

2. Αρχή

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο προσδιορισμούς. Κατά τον πρώτο, το δείγμα υφίσταται επεξεργασία με αραιωμένο υδροχλωρικό οξύ. Ύστερα από διαύγαση και διήθηση, μετριέται η οπτική στροφική ικανότητα του διαλύματος με πολωσιμετρία.

Κατά τον δεύτερο, το δείγμα εκχυλίζεται με αιθανόλη 40 %. Κατόπιν οξύνισης του διηθήματος με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος, διαύγασης και διήθησης, μετριέται η οπτική στροφική ικανότητα υπό τις ίδιες συνθήκες όπως και στον πρώτο προσδιορισμό.

Η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων πολλαπλασιάζεται επί έναν γνωστό συντελεστή δίδει την περιεκτικότητα του δείγματος σε άμυλο.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Υδροχλωρικό οξύ, διάλυμα 25 % (κ.β.) πυκνότητα: 1,126 g/ml.

3.2. Υδροχλωρικό οξύ, διάλυμα 1,13 % (κ.ό.)

Η συμπύκνωση πρέπει να ελέγχεται με ογκομετρική τιτλοδότηση, με τη χρήση διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 0,1 N παρουσία ερυθρού του μεθυλίου 0,1 % (κ.ό.) σε αιθανόλη 94 % (κατ' όγκο). Για την εξουδετέρωση των 10 ml, απαιτούνται 30,94 ml NaOH συγκέντρωσης 0,1 mol/litre.

3.3. Διάλυμα Carrez I: διαλύονται σε νερό 21,9 g οξικού ψευδαργύρου $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 3 g άνυδρου οξικού οξέος. Συμπληρώνεται με νερό έως 100 ml.

3.4. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Συμπληρώνεται με νερό έως 100 ml.

3.5. Αιθανόλη 40 % (ο/ο), πυκνότητα: 0,948 g/ml στους 20 °C.

4. Όργανα

4.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) 250 ml με σύνθετες εσφυρισμένο πόμα συνδεδεμένη με κάθετο ψυκτήρα.

4.2. Πολωσίμετρο ή σακχαρόμετρο.

5. Διαδικασία

5.1. Προετοιμασία του δείγματος

Κονιοποιείται το δείγμα έτσι ώστε να διέρχεται όλη η ποσότητα αυτού διά μέσου κοσκίνου στρογγυλών οπών διαμέτρου 0,5 mm.

5.2. Προσδιορισμός της συνολικής οπτικής στροφικής ικανότητας (*P* ή *S*) (βλέπε παρατήρηση 7.1)

Ζυγίζονται 2,5 g κονιοποιημένου δείγματος με προσέγγιση 1 mg και εισάγονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml. Προστίθενται 25 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2), ανακινούνται προς επίτευξη καλής κατανομής της ποσότητας του δείγματος και προστίθενται εκ νέου άλλα 25 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2). Η φιάλη εμβαπτίζεται εντός ζέοντος υδρόλουτρου και κατά τη διάρκεια των πρώτων επομένων 3 λεπτών ανακινείται έντονα και σταθερά προς αποφυγή σχηματισμού συσσωματώσεων. Η ποσότητα του νερού στο υδρόλουτρο πρέπει να είναι επαρκής για να επιτρέπει τη διατήρηση του λουτρού στο σημείο βρασμού κατά το χρονικό διάστημα της παραμονής της φιάλης εντός αυτού. Η

⁽¹⁾ EE L 125 της 23.5.1996, σ. 35.

▼B

φιάλη δεν πρέπει να εξέρχεται του λουτρού κατά τη διάρκεια της ανακίνησης. Μετά πάροδο 15 λεπτών ακριβώς εξάγεται η φιάλη από το λουτρό, προστίθενται 30 ml ψυχρού νερού και ψύχεται αμέσως σε 20 °C.

Προστίθενται 5 ml διαλύματος Carrez I (3.3) και ανακινείται επί 30 δευτερόλεπτα περίπου. Προστίθενται ακολούθως 5 ml διαλύματος Carrez II (3.4) και ανακινείται εκ νέου επί 30 δευτερόλεπτα περίπου. Συμπληρώνεται ο όγκος της φιάλης με νερό, ομοιογενοποιείται και διηθείται. Εάν το διήθημα δεν είναι πλήρως διαυγές (σπάνια περίπτωση), ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται με τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ποσοτήτων διαλυμάτων Carrez I και II, επί παραδείγματι 10 ml.

Μετριέται ακολούθως η οπτική στροφική ικανότητα του διαλύματος εντός σωλήνα 200 mm με πολωσίμετρο ή σακχαρόμετρο.

5.3. *Προσδιορισμός της οπτικής στροφικής ικανότητας (P ή S) των διαλυτών προσμίξεων σε αιθανόλη 40 %*

Ζυγίζονται 5 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg, εισάγονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml και προστίθενται 80 ml περίπου αιθανόλης (3.5) (βλέπε παρατήρηση 7.2). Αφήνεται η φιάλη σε ηρεμία επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια του χρονικού αυτού διαστήματος ανακινείται έντονα έξι φορές κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ποσότητα του δείγματος να αναμιχθεί καλά με την αιθανόλη. Συμπληρώνεται ακολούθως ο όγκος με αιθανόλη (3.5), ομοιογενοποιείται και διηθείται.

Εισάγονται με σιφόνιο 50 ml του διηθήματος (αντιστοιχούν σε 2,5 g δείγματος) εντός της κωνικής φιάλης των 250 ml, προστίθενται 2,1 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1) και ανακινείται έντονα. Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας στην κωνική φιάλη η οποία βυθίζεται εντός ζέοντος υδρόλουτρου. Μετά 15 λεπτά ακριβώς εξάγεται η κωνική φιάλη από το υδρόλουτρο, μεταγγίζεται το περιεχόμενο αυτής εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml εκπλύνοντας με ελαφρώς ψυχρό νερό και ψύχεται μέχρι 20 °C.

Διαυγάζεται ακολούθως με τη χρήση των διαλυμάτων Carrez I (3.3) και II (3.4), συμπληρώνεται ο όγκος με νερό, ομοιογενοποιείται, διηθείται και μετριέται η οπτική στροφική ικανότητα όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.2, δεύτερη και τρίτη υποπαράγραφος.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η επί τοις εκατό περιεκτικότητα του δείγματος σε άμυλο υπολογίζεται ως ακολούθως:

6.1. *Μετρήσεις διενεργούμενες με πολωσίμετρο*

$$\text{Περιεκτικότητα σε άμυλο (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = συνολική στροφική ικανότητα σε μοίρες

P' = οπτική στροφική ικανότητα σε μοίρες των ουσιών που διαλύονται σε αιθανόλη 40 % (κατ' όγκο)

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = η ειδική οπτική στροφική ικανότητα καθαρού αμύλου. Οι συμβατικά D αποδεκτές τιμές του συντελεστή αυτού είναι οι κάτωθι:

+185,9°:	άμυλο ορύζης
+185,7°:	άμυλο γεωμήλων
+184,6°:	άμυλο αραβοσίτου
+182,7°:	άμυλο σίτου
+181,5°:	άμυλο κριθής
+181,3°:	άμυλο βρώμης
+184,0°:	άλλοι τύποι και μείγματα αμύλου των σύνθετων ζωοτροφών

6.2. *Μετρήσεις διενεργούμενες με σακχαρόμετρο*

$$\text{Περιεκτικότητα σε άμυλο (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

▼ B

- S = συνολική οπτική στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς
 S' = οπτική στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς των ουσιών που διαλύονται, σε αιθανόλη 40 % (ο/ο)
 N = βάρος σε g σακχαρόζης εντός 100 ml νερού που παρέχουν οπτική στροφική ικανότητα 100 σακχαρομετρικών βαθμών εντός σωλήνος 200 mm
 16,29 g για γαλλικά σακχαρόμετρα
 26,00 g για γερμανικά σακχαρόμετρα
 20,00 g για μεικτά σακχαρόμετρα
 $[\alpha]_D^{20^\circ}$ = ειδική οπτική στροφική ικανότητα καθαρού αμύλου (βλέπε 6.1)

6.3. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά των αποτελεσμάτων των δύο παράλληλα διενεργουμένων προσδιορισμών του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,4 σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητα αμύλου μικρότερη του 40 % και 1 % σε σχετική τιμή για περιεκτικότητα αμύλου ίση ή μεγαλύτερη του 40 %.

7. **Παρατηρήσεις**

- 7.1. Εάν το δείγμα περιέχει ανθρακικά άλατα πλέον του 6 % εκφρασμένα σε ανθρακικά άλατα ασβεστίου, πρέπει αυτά να εξουδετερωθούν με τη χρήση της απαιτούμενης ακριβούς ποσότητας αραιωμένου θειικού οξέος, πριν από τον προσδιορισμό της συνολικής οπτικής στροφικής ικανότητας.
- 7.2. Στην περίπτωση προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη, όπως η σκόνη ορρού γάλακτος ή το αποβουτυρωμένο γάλα, διενεργούνται τα ακόλουθα, κατόπιν προσθήκης 80 ml αιθανόλης (3.5). Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας στη φιάλη, εμβαπτίζεται η φιάλη σε υδρόλουτρο 50 °C επί 30 λεπτά. Αφήνεται ακολούθως να ψυχθεί και συνεχίζεται η ανάλυση όπως υποδεικνύεται ανωτέρω στην παράγραφο 5.3.
- 7.3. Οι ακόλουθες πρώτες ύλες ζωοτροφών, σε περίπτωση παρουσίας τους σε σημαντική ποσότητα στις ζωοτροφές, είναι γνωστό ότι προκαλούν παράσιτα κατά τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο με την πολωσιμετρική μέθοδο και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα:
- προϊόντα ζαχαροτεύτλων όπως πούλπα ζαχαροτεύτλων, μελάσα ζαχαροτεύτλων, μελασσωμένη πούλπα ζαχαροτεύτλων, βινάσα ζαχαροτεύτλων, ζάχαρη ζαχαροτεύτλων,
 - πούλπα εσπεριδοειδών,
 - λιναρόσπορος· πλακούντες έκθλιψης λιναρόσπορου· πλακούντες εκχυλισμένου λιναρόσπορου,
 - σπόροι κράμβης· πλακούντες έκθλιψης κραμβόσπορων· πλακούντες εκχυλισμένων κραμβόσπορων· φλοιοί κραμβόσπορων,
 - ηλιανθόσπορος· πλακούντες εκχυλισμένου ηλιανθόσπορου· πλακούντες εκχυλισμένου μερικής αποφλοιωμένου ηλιανθόσπορου,
 - πλακούντες έκθλιψης φοινικοκαρυάς, πλακούντες εκχυλισμένης φοινικοκαρυάς,
 - πούλπα γεωμήλων,
 - αφυδατωμένη μαγιά,
 - προϊόντα πλούσια σε ινουλίνη (π.χ. κατάλοιπα επεξεργασίας και άλευρα κολοκασίου),
 - υπολείμματα ζωικού λίπους.

ΠΓ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΗΣ ΤΕΦΡΑΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ακατέργαστη τέφρα.

▼ B**2. Αρχή**

Το δείγμα αποτεφρώνεται στους 550° C. Το υπόλειμμα ζυγίζεται.

3. Αντιδραστήρια

Διάλυμα 20 % (κ.β.) νιτρικού αμμωνίου.

4. Όργανα

4.1. Θερμαντική πλάκα.

4.2. Ηλεκτρική κάμινος με θερμοστάτη.

4.3. Κάψες αποτέφρωσης από πυρίτιο, πορσελάνη ή πλατίνα, παραλληλεπίπεδες (περίπου 60 × 40 × 25 mm) ή στρογγυλές (διαμέτρου: 60 έως 75 mm, ύψους: 20 έως 40 mm).

5. Διαδικασία

Ζυγίζονται 5 g περίπου δείγματος με προσέγγιση 1 mg (2,5 g για προϊόντα που έχουν τάση διόγκωσης) εντός κάψας αποτέφρωσης πριν από τη θέρμανση στους 550 °C, την ψύξη και προζύγισμά της. Τοποθετείται η κάψα επί θερμαντικής πλάκας και θερμαίνεται προοδευτικά μέχρι την ανθρακοποίηση της ύλης. Ακολουθεί αποτέφρωση σύμφωνα με τις παραγράφους 5.1. ή 5.2.

5.1. Εισάγεται η κάψα εντός της ηλεκτρικής καμίνου ρυθμισμένης στους 550 °C. Διατηρείται στη θερμοκρασία αυτή μέχρι τη λήψη λευκής, ανοικτού γκριζού ή ροδόχρου τέφρας, καταφανώς απαλλαγμένης από ανθρακώδη σωματίδια. Η κάψα φέρεται εντός ξηραντήρα, αφήνεται να ψυχθεί και ζυγίζεται αμέσως.

5.2. Εισάγεται η κάψα εντός της ηλεκτρικής καμίνου ρυθμισμένης στους 550 °C. Αποτεφρώνεται για 3 ώρες. Η κάψα φέρεται εντός ξηραντήρα, αφήνεται να ψυχθεί και ζυγίζεται αμέσως. Αποτεφρώνεται εκ νέου για 30 λεπτά ώστε να εξασφαλιστεί ότι το βάρος της τέφρας παραμένει σταθερό (η απώλεια βάρους μεταξύ δύο διαδοχικών ζυγισμάτων πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση από 1 mg).

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Υπολογίζεται το βάρος του υπολείμματος με αφαίρεση του απόβαρα.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. Παρατηρήσεις

7.1. Η τέφρα των υλών που αποτεφρώνονται δύσκολα πρέπει να υπόκειται σε πρώτη αποτέφρωση επί τρεις ώρες τουλάχιστον, να ψύχεται και να προστίθενται σε αυτήν μερικές σταγόνες διαλύματος 20 % νιτρικού αμμωνίου ή νερού (προσεκτικά, προς αποφυγή διασποράς ή συγκόλλησης των σωματιδίων της τέφρας). Συνεχίζεται η αποτέφρωση κατόπιν ξήρανσης σε κλίβανο. Επαναλαμβάνεται ενδεχομένως η εργασία μέχρι την πλήρη αποτέφρωση.

7.2. Για ύλες ανθεκτικές στην κατεργασία η οποία υποδεικνύεται στην παράγραφο 7.1, διενεργούνται τα κάτωθι: κατόπιν αποτέφρωσης επί τρεις ώρες παραλαμβάνεται η τέφρα με θερμό νερό και διηθείται με μικρό ηθμό ελεύθερου τέφρας. Αποτεφρώνεται ο ηθμός και το περιεχόμενο αυτού εντός της αρχικής κάψας. Το διήθημα φέρεται εντός της ψυχθείσας κάψας, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, αποτεφρώνεται και ζυγίζεται.

7.3. Στην περίπτωση των ελαίων και των λιπών, ζυγίζεται με ακρίβεια ποσότητα δείγματος 25 g εντός κάψας ενδεδειγμένης χωρητικότητας. Ανθρακοποιείται με ανάφλεξη της ύλης μέσω ταινίας διηθητικού χάρτου ελεύθερου τέφρας. Μετά από την καύση, υγραίνεται με τη μικρότερη απαραίτητη ποσότητα νερού. Ξηραίνεται και αποτεφρώνεται όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.

▼B**ΙΔ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ ΑΔΙΑΛΥΤΗΣ ΣΤΟ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΟΞΥ****1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό σε ανόργανες ύλες, αδιάλυτες στο υδροχλωρικό οξύ, των ζωοτροφών. Δύο μέθοδοι προβλέπονται ανάλογα με τη φύση του δείγματος.

1.1. *Μέθοδος Α:* εφαρμόσιμη στις απλές οργανικές ζωοτροφές και στις περισσότερες από τις σύνθετες ζωοτροφές.

1.2. *Μέθοδος Β:* εφαρμόσιμη στις ανόργανες ενώσεις και μείγματα καθώς και στις σύνθετες ζωοτροφές των οποίων η περιεκτικότητα σε αδιάλυτα στο υδροχλωρικό οξύ, προσδιοριζόμενη κατά την μέθοδο Α, είναι ανώτερη από 1 %.

2. Αρχή

2.1. *Μέθοδος Α:* το δείγμα απανθρακώνεται, γίνεται κατεργασία της τέφρας, εν βρασμό με υδροχλωρικό οξύ και το αδιάλυτο υπόλειμμα διηθείται και ζυγίζεται.

2.2. *Μέθοδος Β:* γίνεται κατεργασία του δείγματος με υδροχλωρικό οξύ. Το διάλυμα διηθείται, το υπόλειμμα απανθρακώνεται και γίνεται κατεργασία της λαμβανομένης τέφρας όπως στη μέθοδο Α.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Υδροχλωρικό οξύ 3 mol/litre.

3.2. Διάλυμα 20 % (κατ' όγκο) τριχλωροξικού οξέος.

3.3. Διάλυμα 1 % (κατ' όγκο) τριχλωροξικού οξέος.

4. Όργανα

4.1. Θερμαινόμενη πλάκα.

4.2. Φούρνος με σπείρωμα ηλεκτρικό και θερμοστάτη.

4.3. Κάψες αποτέφρωσης από πυρίτιο, πορσελάνη ή πλατίνα παραλληλεπίπεδες (περίπου 60 × 40 × 25 mm) ή κυκλικές (διαμέτρου: 60 έως 75 mm, ύψους: 20 έως 40 mm).

5. Διαδικασία**5.1. Μέθοδος Α**

Αποτεφρώστε την ποσότητα δοκιμής σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται για τον προσδιορισμό της ακατέργαστης τέφρας. Επίσης μπορείτε να χρησιμοποιήσετε την τέφρα που πήρατε από αυτόν τον προσδιορισμό.

Τοποθετήστε την τέφρα μέσα σε ποτήρι των 250 έως 400 ml με τη βοήθεια 75 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1). Φέρτε προσεκτικά το υγρό σε ήπιο βρασμό και διατηρήστε τον επί 15 λεπτά. Διηθήστε το θερμό διάλυμα πάνω σε διηθητικό χαρτί απαλλαγμένο από τέφρα και πλύντε το υπόλειμμα με θερμό νερό μέχρι την εξαφάνιση της όξινης αντίδρασης. Ξηράνατε τον ηθμό που περιέχει το υπόλειμμα και αποτεφρώστε σε προζυγισμένη κάψα σε θερμοκρασία 550 °C τουλάχιστον και 700 °C κατ' ανώτατο όριο. Αφήστε προς ψύξη σε ξηραντήρα και ζυγίστε.

5.2. Μέθοδος Β

Ζυγίστε, με προσέγγιση 1 mg, 5g δείγματος και τοποθετήστε τα σε ποτήρι των 250 έως 400 ml. Προσθέστε διαδοχικά 25 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1), αναμείξτε και περιμένετε να τελειώσει ο αναβρασμός. Προσθέστε ακόμη 50 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1). Περιμένετε το τέλος μιας ενδεχόμενης έκλυσης αερίου, τοποθετήστε εν συνεχεία το ποτήρι μέσα σε ζέον υδατόλουτρο και διατηρήστε το εκεί επί 30 λεπτά ή περισσότερο, αν χρειάζεται, προκειμένου να υδρολυθεί πλήρως το άμυλο που ενδεχομένως υπάρχει. Διηθήστε εν θερμώ επί ηθμού απαλλαγμένου τέφρας και πλύντε τον ηθμό με τη βοήθεια 50 ml θερμού νερού (βλέπε παρατήρηση στην παράγραφο 7). Τοποθετήστε τον ηθμό

▼B

που περιέχει το υπόλειμμα μέσα σε κάψα αποτέφρωσης, ξηράνεται και αποτεφρώνεται σε θερμοκρασία 550 °C τουλάχιστον και 700 °C κατ' ανώτατο όριο. Τοποθετήστε εν συνεχεία την τέφρα σε ποτήρι των 250 έως 400 ml με τη βοήθεια 75 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1)· ακολουθήστε τα υποδεικνύόμενα στην παράγραφο 5.1, δεύτερο εδάφιο.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Υπολογίστε το βάρος του υπολείμματος αφαιρώντας το απόβαρο. Εκφράστε το αποτέλεσμα σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. **Παρατήρηση**

Εάν η διήθηση αποδεικνύεται δύσκολη, επαναλάβετε τον προσδιορισμό αντικαθιστώντας τα 50 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1) με 50 ml τριχλωροξικού οξέος 20 % (3.2) και εκπλένοντας τον ηθμό με τη βοήθεια θερμού διαλύματος τριχλωροξικού οξέος 1 % (3.3).

IE. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΡΑΚΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των ανθρακικών αλάτων, συμβατικώς εκπεφρασμένων σε ανθρακικό ασβέστιο, που υπάρχουν στις περισσότερες ζωοτροφές.

Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις (ανθρακικός σίδηρος, για παράδειγμα), πρέπει να χρησιμοποιείται ιδιαίτερη μέθοδος.

2. **Αρχή**

Τα ανθρακικά άλατα διασπώνται με υδροχλωρικό οξύ. Το απελευθερούμενο διοξείδιο του άνθρακος συλλέγεται εντός βαθμονομημένου σωλήνα και ο όγκος του συγκρίνεται με αυτόν που εκλύεται με τις ίδιες συνθήκες από γνωστή ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Υδροχλωρικό οξύ, πυκνότητα 1,10 g/ml.

3.2. Ανθρακικό ασβέστιο.

3.3. Θεικό οξύ, 0,05 mol/litre περίπου, κεχρωσμένο με ερυθρόν του μεθυλίου.

4. **Όργανα**

Συσκευή Scheibler-Dietrich (βλέπε σχήμα) ή ισοδύναμη συσκευή.

5. **Λαδιακασία**

Αναλόγως της περιεκτικότητας του δείγματος σε ανθρακικά άλατα, ζυγίζεται ποσότητα δείγματος όπως υποδεικνύεται κατωτέρω:

— 0,5 g για προϊόντα που περιέχουν 50 έως 100 % ανθρακικά άλατα, εκπεφρασμένα σε ανθρακικό ασβέστιο.

— 1 g για προϊόντα που περιέχουν 10 έως 50 % ανθρακικά άλατα, εκπεφρασμένα σε ανθρακικό ασβέστιο.

— 2 g έως 3 g για τα υπόλοιπα προϊόντα.

Εισάγεται η ποσότητα του δείγματος εντός της ειδικής φιάλης (4) της συσκευής, εφοδιασμένης με μικρό σωλήνα από άθραυστη ύλη που περιέχει 10 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1) και συνδέεται με τη συσκευή. Ο κρουνός τριπλής κατεύθυνσης (5) στρέφεται κατά τρόπον ώστε ο σωλήνας (1) να επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον. Με τη χρήση του κινητού σωλήνα (2) ο οποίος είναι πληρωμένος με κεχρωσμένο θεικό οξύ (3.3) και συνδεδεμένος με το βαθμονομημένο σωλήνα (1), το επίπεδο του υγρού φέρεται στη διαβάθμιση μηδέν. Ο κρουνός (5) στρέφεται έτσι ώστε να φέρει σε επικοινωνία τους σωλήνες (1) και (2) και ελέγχεται το επίπεδο μηδέν.

Αφήνεται το υδροχλωρικό οξύ (3.1) να ρεύσει αργά επί της ποσότητας του δείγματος με κλίση της φιάλης (4), εξισορροπείται η πίεση με κλίση του σωλήνα (2). Ανακινείται η φιάλη (4) μέχρι την πλήρη παύση της έκλυσης διοξειδίου του άνθρακος.

Αποκαθίσταται η πίεση μέσω της επαναφοράς του υγρού στο ίδιο ύψος εντός των σωλήνων (1) και (2). Αναγιγνώσκεται η ένδειξη αφού περάσουν *μερικά λεπτά*, οπότε ο όγκος του αερίου καθίσταται σταθερός.

Υπό αυτές τις συνθήκες διενεργείται πείραμα αναφοράς επί 0,5 g ανθρακικού ασβεστίου (3.2).

▼ B**6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα ανθρακικών αλάτων, εκπεφρασμένων σε ανθρακικό ασβέστιο υπολογίζεται με τον τύπο:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

όπου:

X = % (w/w) ανθρακικών αλάτων στο δείγμα, εκπεφρασμένων σε ανθρακικό ασβέστιο

V = ml CO_2 απελευθερωμένων από τη ποσότητα του δείγματος.

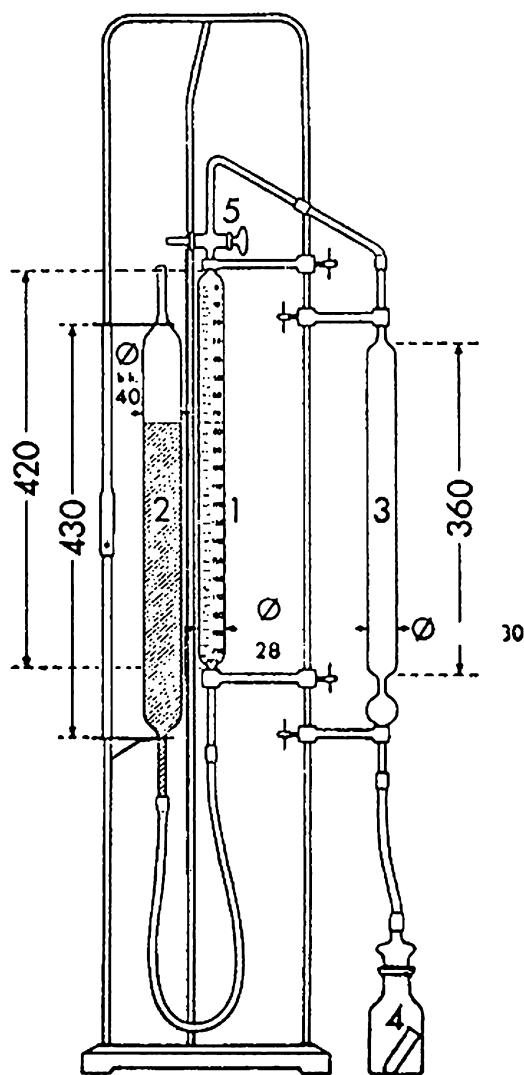
V_1 = ml CO_2 απελευθερωμένων υπό 0,5 g CaCO_3 .

m = βάρος της ποσότητας του δείγματος σε γραμμάρια.

7. Παρατηρήσεις

- 7.1. Όταν η ποσότητα του δείγματος υπερβαίνει τα 2 g, εισάγονται προηγουμένως εντός της φιάλης (4) 15 ml απεσταγμένου νερού και αναμειγνύεται πριν από την έναρξη του πειράματος. Για το πείραμα αναφοράς χρησιμοποιείται ο ίδιος όγκος νερού.
- 7.2. Αν χρησιμοποιείται συσκευή διαφορετικού όγκου από εκείνη των Scheibler-Dietrich, η λαμβανόμενη ποσότητα δείγματος και ουσίας αναφοράς πρέπει να προσαρμόζεται όπως και ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων.

ΣΥΣΚΕΥΗ SCHEIBLER-DIETRICH ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ CO_2



(μετράται σε mm)

▼ B

ΙΣΤ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ

ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ολικό φώσφορο. Ενδείκνυται ιδιαίτερος για την ανάλυση προϊόντων πτωχών σε φώσφορο. Σε ορισμένες περιπτώσεις (προϊόντα πλούσια σε φώσφορο) μπορεί να εφαρμοσθεί μέθοδος σταθμικής ανάλυσης.

2. Αρχή

Το δείγμα μεταλλοποιείται, είτε διά της ξηράς οδού (ξηρής καύσης) (στην περίπτωση των οργανικών τροφών), είτε διά της υγράς οδού (στην περίπτωση των μεταλλικών ενώσεων και των ρευστών τροφών) και φέρεται σε όξινο διάλυμα. Το διάλυμα υποβάλλεται σε κατεργασία με μολυβδοβαναδικό αντιδραστήριο. Η οπτική πυκνότητα του κίτρινου διαλύματος που σχηματίζεται μετράται με φασματοφωτόμετρο σε 430 nm.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Ανθρακικό ασβέστιο.

3.2. Υδροχλωρικό οξύ, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (περίπου 6 mol/litre).

3.3. Νιτρικό οξύ, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Νιτρικό οξύ, $\rho_{20} = 1,38$ έως 1,42 g/ml.

3.5. Θειικό οξύ, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.6. Μολυβδοβαναδικό αντιδραστήριο: Αναμειγνύονται 200 ml διαλύματος επταμολυβδαινικού αμμωνίου (3.6.1), 200 ml διαλύματος μονοβαναδικού αμμωνίου (3.6.2) και 134 ml νιτρικού οξέος (3.4) εντός ογκομετρικής φιάλης ενός λίτρου. Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό.

3.6.1. Διάλυμα επταμολυβδαινικού αμμωνίου: Σε θερμό νερό διαλύονται 100 g επταμολυβδαινικού αμμωνίου ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Προστίθενται 10 ml αμμωνίας (πυκνότητας 0,91 g/ml) και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι ενός λίτρου.

3.6.2. Διάλυμα μονοβαναδικού αμμωνίου: Διαλύονται εντός 400 ml θερμού νερού 2,35 g μονοβαναδικού αμμωνίου NH_4VO_3 . Προστίθενται βραδέως και με ανακίνηση 20 ml αραιού νιτρικού οξέος [7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O] και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι ενός λίτρου.

3.7. Πρότυπο διάλυμα ενός (1) mg φωσφόρου ανά ml: Διαλύεται εντός νερού ποσότητα 4,387 g δισοξίνου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 . Ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι ενός λίτρου.

4. Όργανα

4.1. Χωνευτήρια αποτέφρωσης από πυρίτιο, πορσελάνη ή πλατίνα.

4.2. Ηλεκτρική κάμινος με διαμερίσματα εφοδιασμένα με θερμοστάτη ρυθμιζόμενο στους 550 °C.

4.3. Φιάλη Kjeldahl των 250 ml.

4.4. Ογκομετρικές φιάλες και σιφόνια ακριβείας.

4.5. Φασματοφωτόμετρο.

4.6. Δοκιμαστικοί σωλήνες διαμέτρου 16 mm περίπου με συμριδωμένα στόμια διαμέτρου 14,5 mm. Χωρητικότητα 25 έως 30 ml.

5. Διαδικασία

5.1. Παρασκευή του διαλύματος

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, παρασκευάζεται διάλυμα όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1.1 ή 5.1.2.

5.1.1. Συνήθης διαδικασία

Ζυγίζεται ένα 1 g ή περισσότερο δείγματος με προσέγγιση 1 mg. Η ποσότητα του δείγματος εισάγεται εντός φιάλης Kjeldahl, προστίθεται ποσότητα 20 ml θειικού οξέος (3.5), ανακινείται προς πλήρη διαποτισμό των υλών με το οξύ και προς αποφυγή επικάλυψης αυτών των υλών επί των πλευρών της φιάλης, θερμαίνεται και διατηρείται επί 10 λεπτά σε

▼B

κατάσταση βρασμού. Αφήνεται να ψυχθεί ελαφρώς, προστίθενται 2 ml νιτρικού οξέος (3.4), θερμαίνεται ηπίως, αφήνεται να ψυχθεί ελαφρώς, προστίθεται εκ νέου λίγο νιτρικό οξύ (3.4) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Επαναλαμβάνονται οι ίδιες ενέργειες μέχρι την επίτευξη αχρώμου διαλύματος. Ψύχεται, προστίθεται λίγο νερό, μεταγγίζεται το υγρό εντός ογκομετρικής φιάλης των 500 ml, εκπλύνοντας τη φιάλη Kjeldahl με θερμού νερού. Αφήνεται να ψυχθεί, συμπληρώνεται ο όγκος με νερό, ομοιογενοποιείται και διηθείται.

5.1.2. Δείγματα που περιέχουν οργανικές ύλες και ελεύθερα δισόξινο φωσφορικό ασβεστίου και μαγνησίου

Ζυγίζονται 2,5 g περίπου δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, εντός χωνευτηρίου αποτέφρωσης. Η ποσότητα του δείγματος αναμειγνύεται μέχρι την πλήρη ανάμειξη ενός 1 g ανθρακικού ασβεστίου (3.1.). Ασβεστοποιείται εντός της καμίνου στους 550 °C μέχρι την επίτευξη λευκής ή φαιάς τέφρας (μικρή ποσότητα άνθρακος δεν εμπνέει ανησυχία). Μεταγγίζεται η τέφρα εντός γυάλινου ποτηριού ζέσεως των 250 ml. Προστίθενται 20 ml νερού και υδροχλωρικό οξύ (3.2) μέχρι την παύση του αφρισμού. Προστίθενται ακολούθως άλλα 10 ml υδροχλωρικού οξέος (3.2). Φέρεται το γυάλινο ποτήρι ζέσεως σε αμμόλουτρο και εξατμίζεται μέχρι ξήρανσης προς αδιαλυτοποίηση του χαλαζία. Επαναδιαλύεται το υπόλειμμα με 10 ml νιτρικού οξέος (3.3) και βράζεται επί του αμμόλουτρου ή της θερμαινόμενης πλάκας επί 5 λεπτά, χωρίς εξάτμιση μέχρι την ξήρανση. Μεταγγίζεται το υγρό εντός ογκομετρικής φιάλης των 500 ml, εκπλύνοντας το γυάλινο ποτήρι ζέσεως πολλές φορές με θερμό νερό. Αφήνεται να ψυχθεί, ο όγκος συμπληρώνεται με νερό, ομοιογενοποιείται και διηθείται.

5.2. Ανάπτυξη του χρωματισμού και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

Μέρος της ποσότητας του διηθήματος που προέκυψε βάσει της παραγράφου 5.1.1 ή 5.1.2 αραιώνεται προς επίτευξη συγκέντρωσης φωσφόρου μέχρι 40 mg/ml κατ' ανώτατο όριο. Εισάγονται 10 ml του διαλύματος εντός δοκιμαστικού σωλήνα (4.6) και προστίθενται 10 ml του μολυβδοβαναδικού αντιδραστήριου (3.6). Ομοιογενοποιείται και αφήνεται σε ηρεμία επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία τουλάχιστον 20 °C. Η οπτική πυκνότητα μετράται με το φασματοφωτόμετρο σε 430 nm μέσω σύγκρισης με το διάλυμα που προκύπτει διά της προσθήκης 10 ml μολυβδοβαναδικού αντιδραστήριου (3.6) σε 10 ml νερού.

5.3. Καμπύλη βαθμονόμησης

Βάσει του πρότυπου διαλύματος (3.7) παρασκευάζονται διαλύματα που περιέχουν αντιστοίχως 5, 10, 20, 30 και 40 μg φωσφόρου ανά ml. Λαμβάνονται 10 ml από κάθε ένα εκ των διαλυμάτων αυτών στα οποία προστίθενται 10 ml μολυβδοβαναδικού αντιδραστήριου (3.6). Ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία τουλάχιστον 20 °C. Μετράται η οπτική πυκνότητα υπό τις συνθήκες που καθορίζονται στην παράγραφο 5.2. Η καμπύλη βαθμονόμησης διαμορφώνεται χαράσσοντας τη γραμμή των σημείων τομής των τιμών οπτικής πυκνότητας και των αντίστοιχων ποσοτήτων φωσφόρου. Για συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0 και 40 μg/ml η καμπύλη είναι γραμμική.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Προσδιορίζεται η ποσότητα φωσφόρου εντός της ποσότητας δείγματος μέσω αναφοράς στην καμπύλη βαθμονόμησης.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται επί τοις εκατό του δείγματος.

Επαναληψιμότητα

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

— 3 % σε σχετική τιμή για περιεκτικότητες σε φώσφορο μικρότερες του 5 %,

— 0,15 % σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε φώσφορο ίσες ή μεγαλύτερες του 5 %.

▼B**ΙΖ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥ ΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥΧΩΝ****1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του χλωρίου των χλωριούχων των διαλυτών στο νερό, συμβατικά εκπεφρασμένου σε χλωριούχο νάτριο. Είναι εφαρμόσιμη σε όλες τις ζωοτροφές.

2. Αρχή

Τα χλωριούχα διαλύονται στο νερό. Εάν το προϊόν περιέχει οργανικές ουσίες προβείτε σε αποστράγγιση. Το διάλυμα οξυνίζεται ελαφρά με νιτρικό οξύ και τα χλωριούχα καταβυθίζονται ως χλωριούχος άργυρος με τη βοήθεια διαλύματος νιτρικού αργύρου. Η περίσσεια νιτρικού αργύρου ογκομετρείται με ένα διάλυμα θειοκυανιούχου αμμωνίου, κατά τη μέθοδο Volhard.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Διάλυμα θειοκυανιούχου αμμωνίου 0,1 mol/litre.
- 3.2. Διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1 mol/litre.
- 3.3. Κεκορεσμένο διάλυμα θεικού σιδηροαμμωνίου $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Νιτρικό οξύ, πυκνότητα: 1,38 g/ml.
- 3.5. Διαιθυλικός αιθέρας.
- 3.6. Ακετόνη.
- 3.7. Διάλυμα Carrez I: διαλύστε στο νερό 21,9 g οξικού ψευδαργύρου, Zn $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 3 g κρυσταλλικού οξικού οξέος. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.
- 3.8. Διάλυμα Carrez II: διαλύστε στο νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχο κάλιο $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.
- 3.9. Ενεργός άνθρακας, απαλλαγμένος χλωριούχων και μη επιδεκτικός προσρόφησης χλωριούχων.

4. Όργανα

Αναμεικτής (παλινδρομητής): περίπου 35 έως 40 αναστροφές ανά λεπτό.

5. Διαδικασία**5.1. Ετοιμασία του διαλύματος**

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, ετοιμάστε ένα διάλυμα όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.1.1, 5.1.2 ή 5.1.3.

Πραγματοποιήστε παράλληλα *τυφλό πείραμα* απαλλαγμένο από το προς ανάλυση δείγμα.

5.1.1. Δείγματα απαλλαγμένα οργανικής ύλης

Ζυγίστε, με ακρίβεια 1 mg, μια ποσότητα δοκιμής (όχι μεγαλύτερη των 10 g), που να μην περιέχει περισσότερο από 3 g χλωρίου σε μορφή χλωριούχων και τοποθετήστε την σε μια ογκομετρική φιάλη των 500 ml με 400 ml νερού θερμοκρασίας 20 °C περίπου. Αναμείξτε επί 30 λεπτά στον παλινδρομητή, συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή, ομογενοποιήστε και διηθήστε.

5.1.2. Δείγματα που περιέχουν οργανικές ύλες, εκτός των προϊόντων που αναφέρονται στην παράγραφο 5.1.3.

Ζυγίστε, με ακρίβεια 1 mg, 5 g περίπου δείγματος και τοποθετήστε τα μαζί με 1 g ενεργού άνθρακα σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml. Προσθέστε 400 ml νερού θερμοκρασίας 20 °C περίπου και 5 ml διαλύματος Carrez I (3.7), ανακινήστε και προσθέστε κατόπιν 5 ml διαλύματος Carrez II (3.8). Αναμείξτε επί 30 λεπτά στον παλινδρομητή, συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή, ομογενοποιήστε και διηθήστε.

▼B

- 5.1.3. Ζωοτροφές ψημένες, πίττες και άλευρο λιναριού, προϊόντα πλούσια σε άλευρο λιναριού και άλλα προϊόντα πλούσια σε μυκυλιώματα ή σε κολλοειδείς ουσίες (π.χ. άμυλο σε μορφή δεξτρίνης)

Ετοιμάστε το διάλυμα όπως υποδεικνύεται στην 5.1.2 αλλά μην διηθείτε. Αφήστε προς καταστάλαξη (εάν είναι απαραίτητο, φυγοκεντρήστε), παραλάβετε 100 ml από το υγρό που επιπλέει και εισαγάγετέ τα σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Αναμείξτε με ακετόνη (3.6) και συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με τον διαλύτη αυτόν, ομογενοποιήστε και διηθήστε.

5.2. *Ογκομέτρηση*

Εισαγάγετε με προχοΐδα μέσα σε κωνική φιάλη 25 έως 100 ml από το διήθημα (ανάλογα με την αναμενόμενη περιεκτικότητα σε χλώριο) που πάρθηκε κατά τις παραγράφους 5.1.1, 5.1.2 ή 5.1.3. Η ποσότητα αυτή δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 150 mg χλωρίου (Cl). Αραιώστε, αν είναι απαραίτητο, στα 50 ml τουλάχιστον με νερό, προσθέστε 5 ml νιτρικού οξέος (3.4), 20 ml κεκορεσμένου διαλύματος θειϊκού σιδηροαμμωνίου (3.3) και 2 σταγόνες διαλύματος θειοκυανιούχου αμμωνίου (3.1), με προχοΐδα γεμάτη μέχρι τη χαραγή μηδέν. Μεταφέрте εν συνεχεία με προχοΐδα το διάλυμα νιτρικού αργύρου (3.2) έτσι ώστε να δημιουργηθεί περίσσεια των 5 ml. Προσθέστε 5 ml διαιθυλικού αιθέρα (3.5) και ανακινήστε δυνατά ώστε το ίζημα να συσσωματωθεί. Ογκομετρήστε την περίσσεια του νιτρικού αργύρου με το διάλυμα του θειοκυανιούχου αμμωνίου (3.1) μέχρις ότου η αλλαγή του χρώματος στο ερυθροκαστανό επιμένει επί ένα λεπτό.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η ποσότητα του χλωρίου (X), εκφρασμένη σε χλωριούχο νάτριο επί τοις εκατό, δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

όπου:

V_1 = ml διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,1 mol/l που προστέθηκαν

V_2 = ml διαλύματος θειοκυανιούχου αμμωνίου 0,1 mol/l που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ογκομέτρηση

m = βάρος του δείγματος.

Εάν το τυφλό πείραμα υποδεικνύει κατανάλωση διαλύματος νιτρικού αργύρου 0,1 mol/l, αφαιρέστε αυτόν τον όγκο από τον όγκο ($V_1 - V_2$).

7. **Παρατηρήσεις**

- 7.1. Η ογκομέτρηση μπορεί επίσης να γίνει ποτενσιομετρικώς.
- 7.2. Για προϊόντα πολύ πλούσια σε λιπαρές ύλες, προχωρήστε σε προηγούμενη απολίπανση με διαιθυλικό αιθέρα ή πετρελαϊκό αιθέρα.
- 7.3. Για ιχθυάλευρα, η ογκομέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο Mohr.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

**ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΣΕ ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΥΛΕΣ**
A. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α
1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος αποσκοπεί στον προσδιορισμό της βιταμίνης Α (ρετινόλη) σε ζωοτροφές και προμείγματα. Στον όρο βιταμίνη Α περιλαμβάνονται η ολο-*trans*-ρετινόλη και τα *cis*-ισομερή της που προσδιορίζονται με την παρούσα μέθοδο. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α εκφράζεται σε διεθνείς μονάδες (IU) ανά kg. Μία IU αντιστοιχεί στη δράση 0,300 μg αλκοολικής ολο-*trans*-βιταμίνης Α ή 0,344 μg οξικής ολο-*trans*-βιταμίνης Α ή 0,550 μg παλμιτικής ολο-*trans*-βιταμίνης Α.

Το όριο προσδιορισμού είναι 2 000 IU βιταμίνης Α/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα υδρολύεται με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου και η βιταμίνη Α εκχυλίζεται με πετρελαϊκό αιθέρα. Ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση και το υπόλειμμα διαλύεται σε μεθανόλη και, εφόσον είναι αναγκαίο, αραιώνεται μέχρι την απαιτούμενη συγκέντρωση. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Α προσδιορίζεται με γρήγη χρωματογραφία αναστροφής φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) χρησιμοποιώντας ανιχνευτή UV ή φθορισμού. Οι χρωματογραφικές παράμετροι επιλέγονται έτσι ώστε να μη γίνεται διαχωρισμός μεταξύ της αλκοολικής ολο-*trans*- βιταμίνης Α και των *cis* ισομερών της.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Αιθανόλη, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40 °C-60 °C
- 3.3. Μεθανόλη
- 3.4. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Διάλυμα ασκορβικού νατρίου, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (βλέπε παρατήρηση 7.7)
- 3.6. Θειούχο νάτριο, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Διάλυμα θειούχου νατρίου, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ σε γλυκερόλη, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (για $x = 9$) (βλέπε παρατήρηση 7.8)
- 3.7. Διάλυμα φαινολοφθαλείνης, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ σε αιθανόλη (3.1)
- 3.8. 2-προπανόλη
- 3.9. Κινητή φάση για HPLC: μείγμα μεθανόλης (3.3) και νερού, π.χ. 980 + 20 ($v + v$). Η ακριβής σχέση καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της χρησιμοποιούμενης στήλης.
- 3.10. Άζωτο, απαλλαγμένο οξυγόνου
- 3.11. Οξική ολο-*trans*-βιταμίνη Α, εξαιρετικά καθαρή, πιστοποιημένης δραστητικότητας, π.χ. $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$
- 3.11.1. Αρχικό διάλυμα οξικής ολο-*trans*-βιταμίνης Α: Σε ογκομετρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 50 mg οξικής βιταμίνης Α (3.11). Διαλύονται σε 2-προπανόλη (3.8) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Η ονομαστική συγκέντρωση του εν λόγω διαλύματος είναι 1 400 IU βιταμίνης Α ανά ml. Η ακριβής συγκέντρωση πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με την παράγραφο 5.6.3.1.
- 3.12. Παλμιτική ολο-*trans*-βιταμίνη Α, εξαιρετικά καθαρή, πιστοποιημένης δραστητικότητας, π.χ. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$

▼B

3.12.1. Αρχικό διάλυμα παλμιτικής ολο-*trans*-βιταμίνης A: Σε ογκομετρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 80 mg παλμιτικής βιταμίνης A (3.12). Διαλύονται σε 2-προπανόλη (3.8) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Η ονομαστική συγκέντρωση του εν λόγω διαλύματος είναι 1 400 IU βιταμίνης A ανά ml. Η ακριβής συγκέντρωση πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με την παράγραφο 5.6.3.2.

3.13. 2,6-δι-*tert*-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη (BHT) (βλέπε παρατήρηση 7.5)

4. Όργανα

4.1. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού

4.2. Αδιαφανή γυάλινα σκεύη

4.2.1. Κωνικές ή σφαιρικές φιάλες με επίπεδο πυθμένα των 500 ml, με εσφυρισμένη υποδοχή

4.2.2. Ογκομετρικές στενόλαιμες φιάλες με εσφυρισμένα πόματα των 10, 25, 100 και 500 ml

4.2.3. Κωνικές διαχωριστικές χοάνες των 1 000 ml, με εσφυρισμένα πόματα

4.2.4. Απιοειδείς φιάλες των 250 ml, με εσφυρισμένες υποδοχές

4.3. Συμπυκνωτής Allihn, με χιτώνιο μήκους 300 mm, με εσφυρισμένη ένωση, με προσαρμογέα για σωλήνα παροχής αερίου

4.4. Πτυχωτός ηθμός για διαχωρισμό φάσεων, διαμέτρου 185 mm (π.χ. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης

4.5.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, C₁₈, 5 ή 10 μm με πλήρωση 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη (κριτήριο απόδοσης: μία μόνον κορυφή για όλα τα ισομερή ρετινόλης υπό τις συνθήκες HPLC)

4.5.2. Ανιχνευτής UV ή φθορισμού, με μεταβαλλόμενο μήκος κύματος

4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες χαλαζία των 10 mm

4.7. Υδρόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα

4.8. Συσκευή εκχύλισης (βλέπε σχήμα 1) αποτελούμενη από:

4.8.1. Γυάλινο κύλινδρο χωρητικότητας 1 l με εσφυρισμένο λαιμό και πόμα

4.8.2. Εσφυρισμένο γυάλινο ένθεμα εφοδιασμένο με πλευρικό βραχίονα και προσαρμόσιμο σωλήνα διερχόμενο από το κέντρο. Το κάτω άκρο του προσαρμόσιμου σωλήνα πρέπει να έχει σχήμα U ενώ στο άλλο άκρο πρέπει να υπάρχει ακροφύσιο έτσι ώστε η πάνω υγρή στιβάδα στον κύλινδρο να μπορεί να μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη.

5. Διαδικασία

Σημείωση: Η βιταμίνη A είναι ευαίσθητη στο υπεριώδες φως και στην οξείδωση. Όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται απουσία φωτός (χρησιμοποιώντας αδιαφανή γυάλινα σκεύη ή σκεύη προστατευόμενα με φύλλο αλουμινίου) και οξυγόνου (πλήρωση με άζωτο). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ο αέρας πρέπει να αντικαθίσταται από άζωτο (αποφεύγεται η υπερβολική πίεση χαλαρώνοντας από καιρού σε καιρό το πόμα).

5.1. Παρασκευή του δείγματος

Το δείγμα αλέθεται έτσι ώστε να διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο οπών 1 mm, προσέχοντας να μην παράγεται θερμότητα. Η άλεση πρέπει να γίνεται **αμέσως** πριν από τη ζύγιση και τη σαπωνοποίηση, αλλιώς μπορεί να υπάρξουν απώλειες βιταμίνης A.

▼B

5.2. Σαπωνοποίηση

Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α, ζυγίζονται σε κωνική ή σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 500 ml (4.2.1), 2 g έως 25 g του δείγματος με προσέγγιση 1 mg. Προστίθενται διαδοχικά υπό ανακίνηση 130 ml αιθανόλης (3.1), περίπου 100 mg BHT (3.13), 2 ml διαλύματος ασκορβικού νατρίου (3.5) και 2 ml διαλύματος θειούχου νατρίου (3.6). Στη φιάλη προσαρμόζεται συμπυκνωτήρας (4.3) και η φιάλη βυθίζεται σε υδρόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα (4.7). Θερμαίνεται μέχρι βρασμού και το διάλυμα αφήνεται υπό αναρροή για 5 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 25 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (3.4) μέσω του συμπυκνωτήρα (4.3) και το διάλυμα αφήνεται υπό αναρροή για 25 λεπτά ακόμη, με ανάδευση υπό ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Ο συμπυκνωτήρας στη συνέχεια εκπλένεται με 20 ml νερό περίπου και το περιεχόμενο της φιάλης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου.

5.3. Εκχύλιση

Το σαπωνοποιημένο διάλυμα μεταγγίζεται ποσοτικά, εκπλένοντάς το με νερό συνολικού όγκου 250 ml, σε διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (4.2.3) ή σε συσκευή εκχύλισης (4.8). Η φιάλη σαπωνοποίησης εκπλένεται διαδοχικά με 25 ml αιθανόλης (3.1) και 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και τα εκπλύματα μεταφέρονται στη διαχωριστική χοάνη ή στη συσκευή εκχύλισης. Η αναλογία νερού-αιθανόλης στα συνενωμένα διαλύματα πρέπει να είναι περίπου 2:1. Το σύνολο ανακινείται έντονα επί 2 λεπτά και αφήνεται να ηρεμήσει για άλλα 2 λεπτά.

5.3.1. Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη (4.2.3)

Μετά το διαχωρισμό των στιβάδων (βλέπε παρατήρηση παράγραφο 7.3), η στιβάδα του πετρελαϊκού αιθέρα μεταφέρεται σε άλλη διαχωριστική χοάνη (4.2.3). Η εκχύλιση αυτή επαναλαμβάνεται δύο φορές, με 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και δύο φορές με 50 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2).

Τα συνενωμένα εκχυλίσματα πλένονται στη διαχωριστική χοάνη δύο φορές με ήπια περιδίνιση (για την αποφυγή σχηματισμού γαλακτωμάτων) με 100 ml νερό κάθε φορά και κατόπιν με επανειλημμένη ανακίνηση με περαιτέρω ποσότητες νερού των 100 ml μέχρις ότου το νερό να παραμένει άχρωμο σε προσθήκη διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης (3.7) (τέσσερις φορές πλύσιμο συνήθως αρκεί). Το πλυμένο εκχύλισμα διηθείται μέσω ξηρού πτυχωτού ηθμού για διαχωρισμό φάσεων (4.4) για την απομάκρυνση τυχόν εναιωρούμενου νερού σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml (4.2.2). Η διαχωριστική χοάνη και ο ηθμός εκπλύνονται με 50 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με πετρελαϊκό αιθέρα (3.2) και αναμειγνύεται καλά.

5.3.2. Εκχύλιση με συσκευή εκχύλισης (4.8)

Μετά το διαχωρισμό των στιβάδων (βλέπε παρατήρηση 7.3), το πόμα του γυάλινου κυλίνδρου (4.8.1) αντικαθίσταται με το εσφυρισμένο ένθεμα (4.8.2) και το σχήματος U κάτω άκρο του προσαρμοζόμενου σωλήνα φέρεται σε τέτοια θέση ώστε να είναι ίσα-ίσα πάνω από το επίπεδο της διαχωριστικής επιφάνειας. Με εφαρμογή πίεσης από γραμμή αζώτου στον πλευρικό βραχίονα, η πάνω στιβάδα του πετρελαϊκού αιθέρα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (4.2.3). Στον γυάλινο κύλινδρο προστίθενται 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), ο κύλινδρος πωματίζεται και ανακινείται καλά. Οι στιβάδες αφήνονται να διαχωριστούν και η πάνω στιβάδα μεταφέρεται όπως πριν στη διαχωριστική χοάνη. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται με 100 ml ακόμη πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), στη συνέχεια δύο φορές με 50 ml κάθε φορά πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και οι στιβάδες του πετρελαϊκού αιθέρα προστίθενται στη διαχωριστική χοάνη.

Τα συνενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.1 και ακολουθείται η περιγραφόμενη εκεί διαδικασία.

5.4. Παρασκευή του δείγματος για την HPLC

Σε αποιεδή φιάλη 250 ml (4.2.4) μεταφέρεται με πιπέτα (σιφόνιο) κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος πετρελαϊκού αιθέρα (από τις παραγράφους 5.3.1 ή 5.3.2). Ο διαλύτης εξατμίζεται σχεδόν μέχρι

▼B

ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (4.1) με ελαττωμένη πίεση και θερμοκρασία λουτρού μη υπερβαίνουσα τους 40 °C. Αποκαθίσταται η ατμοσφαιρική πίεση με εισαγωγή αζώτου (3.10) και η φιάλη απομακρύνεται από τον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ο παραμένον διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (3.10) και το υπόλειμμα διαλύεται αμέσως σε γνωστό όγκο (10-100 ml) μεθανόλης (3.3) (η συγκέντρωση της βιταμίνης A πρέπει να είναι της τάξεως των 5 IU/ml έως 30 IU/ml).

5.5. Προσδιορισμός με HPLC

Η βιταμίνη A διαχωρίζεται σε στήλη ανάστροφης φάσης C₁₈ (4.5.1) και μετράται η συγκέντρωση με τη βοήθεια ανιχνευτή UV (325 nm) ή φθορισμού (διέγερση: 325 nm, εκπομπή: 475 nm) (4.5.2).

Εγχύεται κατάλληλη ποσότητα (π.χ. 20 µl) του μεθανολικού διαλύματος που λαμβάνεται στην παράγραφο 5.4 και εκλούζεται με την κινητή φάση (3.9). Υπολογίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) ορισμένων εγχύσεων του ίδιου δείγματος και τα μέσα ύψη κορυφών (εμβαδά) ορισμένων εγχύσεων των διαλυμάτων βαθμονόμησης (5.6.2).

Συνθήκες HPLC

Για την HPLC πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατωτέρω συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν όμως και άλλες συνθήκες υπό την προϋπόθεση ότι παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Υγρή χρωματογραφική στήλη (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 ή 10 µm πλήρωση, ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.9):	Μείγμα μεθανόλης (3.3) και νερού π.χ. 980 + 20 (v + v).
Ρυθμός ροής:	1-2 ml/min
Ανιχνευτής (4.5.2):	Ανιχνευτής UV (325 nm) ή φθορισμού (διέγερση: 325 nm/εκπομπή: 475 nm)

5.6. Βαθμονόμηση

5.6.1. Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας

Σε κωνική ή σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 500 ml μεταφέρονται με σιφόνιο 20 ml του αρχικού διαλύματος οξικής βιταμίνης A (3.11.1) ή 20 ml του αρχικού διαλύματος παλμιτικής βιταμίνης A (3.12.1) και υδρολύονται όπως περιγράφεται στο σημείο 5.2, αλλά χωρίς προσθήκη BHT. Ακολουθεί εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (3.2) σύμφωνα με την παράγραφο 5.3 και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή των 500 ml με πετρελαϊκό αιθέρα (3.2). 100 ml του εκχυλίσματος αυτού εξατμίζονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (βλέπε 5.4) σχεδόν μέχρι ξηρού, ο εναπομένον διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (3.10) και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 10,0 ml μεθανόλης (3.3). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 560 IU βιταμίνης A ανά ml. Η ακριβής συγκέντρωση πρέπει να προσδιοριστεί σύμφωνα με την παράγραφο 5.6.3.3. Το πρότυπο διάλυμα εργασίας πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

2,0 ml του προτύπου αυτού διαλύματος εργασίας μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.3) και το σύνολο αναμειγνύεται. Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του **αραιωμένου** πρότυπου διαλύματος εργασίας είναι 56 IU βιταμίνης A ανά ml.

5.6.2. Παρασκευή των διαλυμάτων και καμπύλη βαθμονόμησης

1,0, 2,0, 5,0 και 10,0 ml του **αραιωμένου** πρότυπου διαλύματος εργασίας μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 20 ml, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.3) και αναμειγνύονται. Οι ονομαστικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων αυτών είναι 2,8, 5,6, 14,0 και 28,0 IU βιταμίνης A ανά ml.

20 µl κάθε διαλύματος βαθμονόμησης εγχύονται κατ' επανάληψη και προσδιορίζονται τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών. Χρησιμοποιώντας τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών, χαράσσεται καμπύλη βαθμονόμησης λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του ελέγχου με UV (5.6.3.3).

▼B**5.6.3. Τυποποίηση σε UV των πρότυπων διαλυμάτων****5.6.3.1. Αρχικό διάλυμα οξικής βιταμίνης A**

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (4.2.2) μεταφέρονται με σιφόνιο 2,0 ml του αρχικού διαλύματος οξικής βιταμίνης A (3.11.1) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 56 IU βιταμίνης A ανά ml. 3,0 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος οξικής βιταμίνης A μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 6,72 IU βιταμίνης A ανά ml. Μετρίεται το φάσμα UV αυτού του διαλύματος σε σχέση με την 2-προπανόλη (3.8) στο φασματοφωτόμετρο (4.6) μεταξύ 300 nm και 400 nm. Η μέγιστη απόσβεση πρέπει να είναι μεταξύ 325 nm και 327 nm.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

$$\text{IU βιταμίνη A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ για οξική βιταμίνη A = 1 530 στα 326 nm σε 2-προπανόλη)

5.6.3.2. Αρχικό διάλυμα παλμιτικής βιταμίνης A

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (4.2.2) μεταφέρονται με σιφόνιο 2,0 ml του αρχικού διαλύματος παλμιτικής βιταμίνης A (3.12.1) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 56 IU βιταμίνης A ανά ml. 3,0 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος παλμιτικής βιταμίνης A μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 6,72 IU βιταμίνης A ανά ml. Μετρίεται το UV φάσμα αυτού του διαλύματος έναντι 2-προπανόλης (3.8) στο φασματοφωτόμετρο (4.6) μεταξύ 300 nm και 400 nm. Το μέγιστο της απόσβεσης πρέπει να είναι μεταξύ 325 nm και 327 nm.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

$$\text{IU βιταμίνη A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ για παλμιτική βιταμίνη A=957 στα 326nm σε 2-προπανόλη)

5.6.3.3. Πρότυπο διάλυμα εργασίας βιταμίνης A

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (4.2.2) μεταφέρονται με σιφόνιο 3,0 ml του παρασκευασμένου σύμφωνα με την παράγραφο 5.6.1 **μη αραιωμένου** πρότυπου διαλύματος εργασίας βιταμίνης A (3.12.1) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). 5,0 ml του εν λόγω διαλύματος μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με 2-προπανόλη (3.8). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 6,72 IU βιταμίνης A ανά ml. Μετρίεται το UV φάσμα αυτού του διαλύματος έναντι 2-προπανόλης (3.8) στο φασματοφωτόμετρο (4.6) μεταξύ 300 nm και 400 nm. Το μέγιστο της απόσβεσης πρέπει να είναι μεταξύ 325 nm και 327 nm.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

$$\text{IU βιταμίνη A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ για αλκοολική βιταμίνη A = 1 821 στα 325nm σε 2-προπανόλη)

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Από το μέσο ύψος (εμβადόν) των κορυφών της βιταμίνης A του δείγματος προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος σε IU/ml με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης (5.6.2).

▼B

Η συγκέντρωση της βιταμίνης A σε IU/kg του δείγματος δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [IU/kg]}$$

στον οποίο:

c = συγκέντρωση βιταμίνης A στο δείγμα (5.4) σε IU/ml

V₁ = όγκος του δείγματος (5.4) σε ml

V₂ = όγκος της ποσότητας που λαμβάνεται στην παράγραφο 5.4 σε ml

m = βάρος της προς δοκιμή ποσότητας σε g

7. Παρατηρήσεις

- 7.1. Σε δείγματα με χαμηλή συγκέντρωση βιταμίνης A, για τον προσδιορισμό με HPLC ενδέχεται να προσφέρεται περισσότερο η συνένωση των πετρελαϊκών εκχυλισμάτων δύο σαπωνοποιήσεων (ζυγισθείσα ποσότητα: 25 g) σε ένα δείγμα.
- 7.2. Το βάρος του δείγματος που λαμβάνεται για την ανάλυση δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 2 g λίπους.
- 7.3. Εάν δεν επέλθει διαχωρισμός φάσεων, προστίθενται 10 ml περίπου αιθανόλης (3.1) για διάσπαση του γαλακτώματος.
- 7.4. Με μουρουνέλαιο και άλλα καθαρά λίπη, ο χρόνος σαπωνοποίησης πρέπει να παρατείνεται στα 45-60 λεπτά.
- 7.5. Αντί BHT, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδροκινόνη.
- 7.6. Χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης ο διαχωρισμός των ισομερών ρετινόλης είναι εφικτός. Σε αυτή την περίπτωση όμως πρέπει να αθροίζονται τα ύψη (εμβαδά) όλων των κορυφών των ισομερών *cis* και *trans* για τους υπολογισμούς.
- 7.7. Αντί διαλύματος ασκορβικού νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 150 mg ασκορβικού οξέος.
- 7.8. Αντί διαλύματος θειούχου νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 50 mg EDTA.
- 7.9. Σε περιπτώσεις ανάλυσης της βιταμίνης A σε υποκατάστατα γάλακτος, πρέπει να αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στις εξής διεργασίες:

— σαπωνοποίηση (5.2): λόγω της ποσότητας των λιπών που περιέχεται στο δείγμα, μπορεί να απαιτηθεί η αύξηση της ποσότητας του διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (3.4),

— εκχύλιση (5.3): λόγω της αύξησης των γαλακτωμάτων, μπορεί να απαιτηθεί η ρύθμιση της αναλογίας νερού/αιθανόλης 2:1.

Προκειμένου να ελεγχθεί ότι η εφαρμοζόμενη μέθοδος ανάλυσης αποδίδει αξιόπιστα αποτελέσματα στο συγκεκριμένο πλαίσιο (υποκατάστατο γάλακτος), πρέπει να εφαρμοστεί δοκιμή ανάκτησης σε ένα πρόσθετο δείγμα δοκιμής. Αν το ποσοστό ανάκτησης είναι μικρότερο από 80 %, το αποτέλεσμα της ανάλυσης πρέπει να υποβληθεί σε διόρθωση για ανάκτηση.

8. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα πραγματοποιούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 % σε σχέση με το υψηλότερο αποτέλεσμα.

▼B

9. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης ⁽¹⁾

	Πρόμειγμα	Πρόμειγμα ζωοτροφής	Συμπύκνωμα ανόργανων υλικών	Πρωτεϊνούχος ζωοτροφή	Ζωοτροφή για χοιρίδια
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Μέσος όρος [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
S _r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

S_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότηταςS_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

r = επαναληψιμότητα

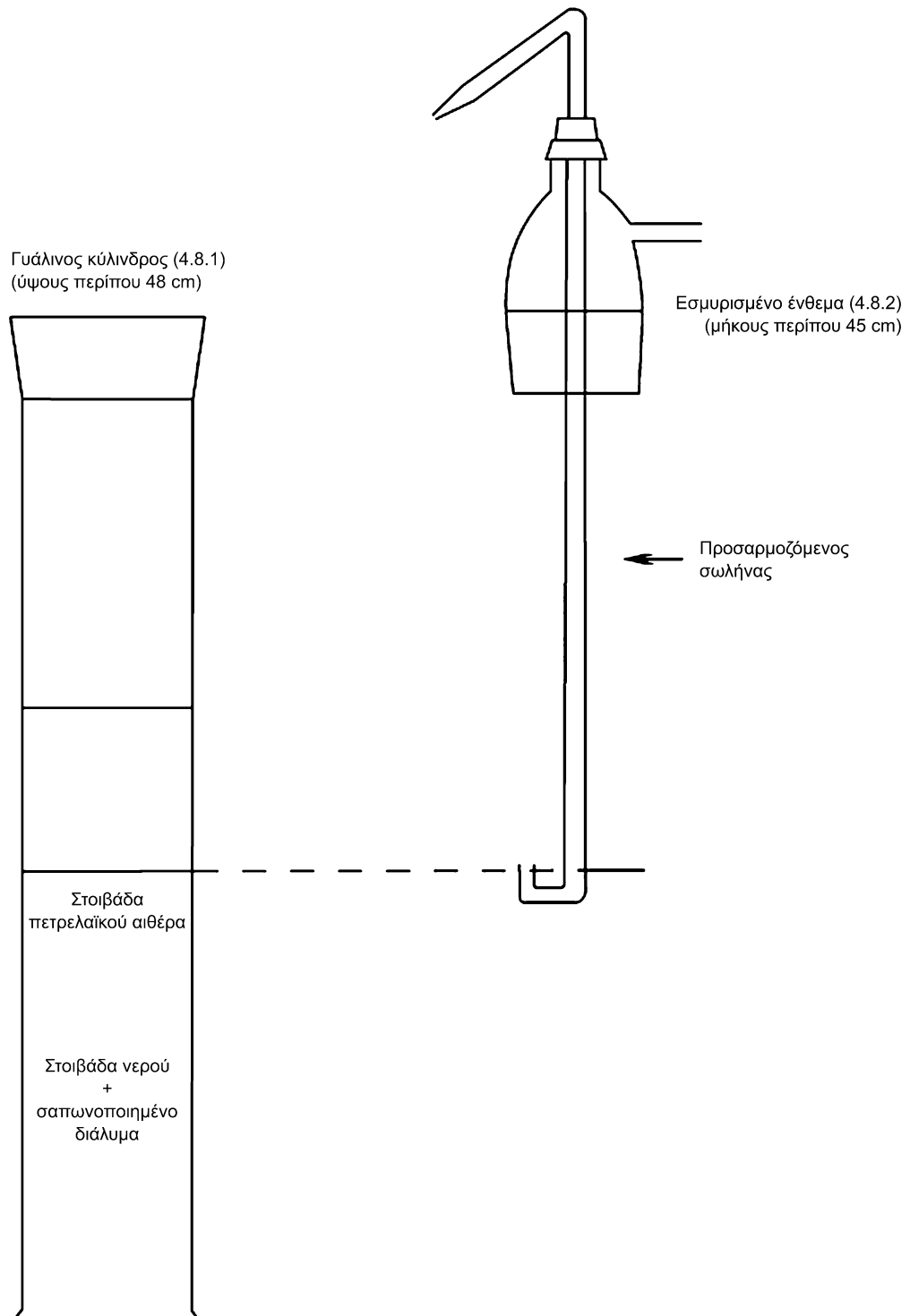
R = αναπαραγωγιμότητα

CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότηταςCV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας

⁽¹⁾ Πραγματοποιήθηκε από την ομάδα εργασίας για τις ζωοτροφές του Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Σχήμα 1: Συσκευή εκχύλισης (4.8)



▼B**B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε****1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της βιταμίνης Ε σε ζωοτροφές και προμείγματα. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε εκφράζεται σε mg οξικής DL-α-τοκοφερόλης ανά kg. 1 mg οξικής DL-α-τοκοφερόλης αντιστοιχεί σε 0,91 mg DL-α-τοκοφερόλης (βιταμίνη Ε).

Το όριο προσδιορισμού είναι 2 mg βιταμίνης Ε/kg. Αυτό το όριο προσδιορισμού είναι επιτεύξιμο μόνο με ανιχνευτή φθορισμού. Με ανιχνευτή UV, το όριο προσδιορισμού είναι 10 mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα υδρολύεται με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου και η βιταμίνη Ε εκχυλίζεται με πετρελαϊκό αιθέρα. Ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση και το υπόλειμμα διαλύεται σε μεθανόλη και, εφόσον είναι αναγκαίο, αραιώνεται μέχρι την απαιτούμενη συγκέντρωση. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Ε προσδιορίζεται με γρήγη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) χρησιμοποιώντας ανιχνευτή UV ή φθορισμού.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Αιθανόλη, $\sigma = 96\%$

3.2. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40 °C-60 °C

3.3. Μεθανόλη

3.4. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$

3.5. Διάλυμα ασκορβικού νατρίου, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (βλέπε παρατήρηση 7.7)

3.6. Θειούχο νάτριο, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)

3.6.1. Διάλυμα θειούχου νατρίου, $c = 0,5\text{ mol/l}$ σε γλυκερόλη, $\beta = 120\text{ g/l}$ (για $x = 9$) (βλέπε παρατήρηση 7.8)

3.7. Διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ σε αιθανόλη (3.1)

3.8. Κινητή φάση για HPLC: μείγμα μεθανόλης (3.3) και νερού, π.χ. 980 + 20 ($v + v$). Η ακριβής σχέση καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά της χρησιμοποιούμενης στήλης.

3.9. Άζωτο, απαλλαγμένο οξυγόνου

3.10. Οξική DL-α-τοκοφερόλη, εξαιρετικά καθαρή, πιστοποιημένης δραστηκότητας

3.10.1. Αρχικό διάλυμα οξικής DL-α-τοκοφερόλης: Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 100 mg οξικής DL-α-τοκοφερόλης (3.10). Διαλύονται σε αιθανόλη (3.1) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. 1 ml αυτού του διαλύματος περιέχει 1 mg οξικής DL-α-τοκοφερόλης (για τον έλεγχο UV βλέπε παράγραφο 5.6.1.3, για τη σταθεροποίηση βλέπε παρατήρηση 7.4).

3.11. DL-α-τοκοφερόλη, εξαιρετικής καθαρότητας, πιστοποιημένης δραστηκότητας

3.11.1. Αρχικό διάλυμα DL-α-τοκοφερόλης: Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 100 mg DL-α-τοκοφερόλης (3.11). Διαλύονται σε αιθανόλη (3.1) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. 1 ml αυτού του διαλύματος περιέχει 1 mg DL-α-τοκοφερόλης (για τον έλεγχο UV βλέπε παράγραφο 5.6.2.3, για τη σταθεροποίηση βλέπε παρατήρηση 7.4).

3.12. 2,6 δι-tert-βουτυλο-4-μεθυλοφαινόλη (BHT) (βλέπε παρατήρηση 7.5).

4. Όργανα

4.1. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου

▼B

- 4.2. Αδιαφανή γυάλινα σκεύη
 - 4.2.1. Κωνικές ή σφαιρικές φιάλες με επίπεδο πυθμένα των 500 ml, με εσφυρισμένη υποδοχή
 - 4.2.2. Ογκομετρικές φιάλες με εσφυρισμένα πόματα των 10, 25, 100 και 500 ml
 - 4.2.3. Κωνικές διαχωριστικές χοάνες των 1 000 ml, με εσφυρισμένα πόματα
 - 4.2.4. Απιοειδείς φιάλες των 250 ml, με εσφυρισμένες υποδοχές
- 4.3. Συμπυκνωτής Allihn, με χιτώνιο μήκους 300 mm, με εσφυρισμένη ένωση, με προσαρμογέα για σωλήνα παροχής αερίου
- 4.4. Πτυχωτός ηθμός για διαχωρισμό φάσεων, διαμέτρου 185 mm (π.χ. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης
 - 4.5.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, C₁₈, με πλήρωση 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη
 - 4.5.2. Ανιχνευτής UV ή φθορισμού, με μεταβαλλόμενο μήκος κύματος
- 4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες χαλαζία των 10 mm
- 4.7. Υδρόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα
- 4.8. Συσκευή εκχύλισης (βλέπε σχήμα 1) αποτελούμενη από:
 - 4.8.1. Γυάλινο κύλινδρο χωρητικότητας 1 l με εσφυρισμένο λαϊμό και πόμα
 - 4.8.2. Εσφυρισμένο γυάλινο ένθεμα εφοδιασμένο με πλευρικό βραχίονα και προσαρμόσιμο σωλήνα διερχόμενο από το κέντρο. Το κάτω άκρο του προσαρμόσιμου σωλήνα πρέπει να έχει σχήμα U ενώ στο άλλο άκρο πρέπει να υπάρχει ακροφύσιο έτσι ώστε η πάνω υγρή στιβάδα στον κύλινδρο να μπορεί να μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη.

5. Διαδικασία

Σημείωση: Η βιταμίνη E είναι ευαίσθητη στο υπεριώδες φως και στην οξείδωση. Όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται απουσία φωτός (χρησιμοποιώντας αδιαφανή γυάλινα σκεύη ή σκεύη προστατευόμενα με φύλλο αλουμινίου) και οξυγόνου (πλήρωση με άζωτο). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ο αέρας πρέπει να αντικαθίσταται από άζωτο (αποφεύγεται η υπερβολική πίεση χαλαρώνοντας από καιρού σε καιρό το πόμα).

5.1. Παρασκευή του δείγματος

Το δείγμα αλέθεται έτσι ώστε να διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο οπών 1 mm, προσέχοντας να μην παράγεται θερμότητα. Η άλεση πρέπει να γίνεται **αμέσως** πριν από τη ζύγιση και τη σαπωνοποίηση, αλλιώς μπορεί να υπάρξουν απώλειες βιταμίνης E.

5.2. Σαπωνοποίηση

Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε βιταμίνη E, ζυγίζονται σε κωνική ή σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 500 ml (4.2.1), 2 g έως 25 g του δείγματος με προσέγγιση 0,01 g. Προστίθενται διαδοχικά υπό ανακίνηση 130 ml αιθανόλης (3.1), περίπου 100 mg BHT (3.12), 2 ml διαλύματος ασκορβικού νατρίου (3.5) και 2 ml διαλύματος θειούχου νατρίου (3.6). Στη φιάλη προσαρμόζεται συμπυκνωτήρας (4.3) και η φιάλη βυθίζεται σε υδρόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα (4.7). Θερμαίνεται μέχρι βρασμού και το διάλυμα αφήνεται υπό αναρροή για 5 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 25 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (3.4) μέσω του συμπυκνωτήρα (4.3) και το διάλυμα αφήνεται υπό αναρροή για 25 λεπτά ακόμη, με ανάδευση υπό ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Ο συμπυκνωτήρας στη συνέχεια εκπλένεται με 20 ml νερό περίπου και το περιεχόμενο της φιάλης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου.

▼B

5.3. *Εκχύλιση*

Το σαπωνοποιημένο διάλυμα μεταγγίζεται ποσοτικά, εκπλένοντάς το με νερό συνολικού όγκου 250 ml, σε διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (4.2.3) ή σε συσκευή εκχύλισης (4.8). Η φιάλη σαπωνοποίησης εκπλένεται διαδοχικά με 25 ml αιθανόλης (3.1) και 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και τα εκπλύματα μεταφέρονται στη διαχωριστική χοάνη ή στη συσκευή εκχύλισης. Η αναλογία νερού-αιθανόλης στα συνενωμένα διαλύματα πρέπει να είναι περίπου 2:1. Το σύνολο ανακινείται έντονα επί 2 λεπτά και αφήνεται να ηρεμήσει για άλλα 2 λεπτά.

5.3.1. *Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη (4.2.3)*

Μετά το διαχωρισμό των στιβάδων (βλέπε παρατήρηση στην παράγραφο 7.3), η στιβάδα του πετρελαϊκού αιθέρα μεταφέρεται σε άλλη διαχωριστική χοάνη (4.2.3). Η εκχύλιση αυτή επαναλαμβάνεται δύο φορές, με 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και δύο φορές με 50 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2).

Τα συνενωμένα εκχυλίσματα πλένονται στη διαχωριστική χοάνη δύο φορές με ήπια περιδίνιση (για την αποφυγή σχηματισμού γαλακτωμάτων) με 100 ml νερό κάθε φορά και κατόπιν με επανειλημμένη ανακίνηση με περαιτέρω ποσότητες νερού των 100 ml μέχρις ότου το νερό να παραμένει άχρωμο σε προσθήκη διαλύματος φαινολοφθαλείνης (3.7) (τέσσερις φορές πλούσιο συνήθως αρκεί). Το πλυμένο εκχύλισμα διηθείται μέσω ξηρού πτυχωτού ηθμού για διαχωρισμό φάσεων (4.4) για την απομάκρυνση τυχόν εναιωρούμενου νερού σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml (4.2.2). Η διαχωριστική χοάνη και ο ηθμός εκπλύνονται με 50 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με πετρελαϊκό αιθέρα (3.2) και αναμειγνύεται καλά.

5.3.2. *Εκχύλιση με συσκευή εκχύλισης (4.8)*

Μετά το διαχωρισμό των στιβάδων (βλέπε παρατήρηση 7.3), το πόμα του γυάλινου κυλίνδρου (4.8.1) αντικαθίσταται με το εσφυρισμένο ένθεμα (4.8.2) και το σχήματος U κάτω άκρο του προσαρμοζόμενου σωλήνα φέρεται σε τέτοια θέση ώστε να είναι ίσα-ίσα πάνω από το επίπεδο της διαχωριστικής επιφάνειας. Με εφαρμογή πίεσης από γραμμή αζώτου στον πλευρικό βραχίονα, η πάνω στιβάδα του πετρελαϊκού αιθέρα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (4.2.3). Στον γυάλινο κύλινδρο προστίθενται 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), ο κύλινδρος πωματίζεται και ανακινείται καλά. Οι στιβάδες αφήνονται να διαχωριστούν και η πάνω στιβάδα μεταφέρεται όπως πριν στη διαχωριστική χοάνη. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται με 100 ml ακόμη πετρελαϊκού αιθέρα (3.2), στη συνέχεια δύο φορές με 50 ml κάθε φορά πετρελαϊκού αιθέρα (3.2) και οι στιβάδες του πετρελαϊκού αιθέρα προστίθενται στη διαχωριστική χοάνη.

Τα συνενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3.1 και ακολουθείται η περιγραφόμενη εκεί διαδικασία.

5.4. *Παρασκευή του δείγματος για την HPLC*

Σε αποιοδή φιάλη 250 ml (4.2.4) μεταφέρεται με πιπέτα (σιφόνιο) κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος πετρελαϊκού αιθέρα (από την παράγραφο 5.3.1 ή 5.3.2). Ο διαλύτης εξατμίζεται σχεδόν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (4.1) με ελαττωμένη πίεση και θερμοκρασία λουτρού μη υπερβαίνουσα τους 40 °C. Αποκαθίσταται η ατμοσφαιρική πίεση με εισαγωγή αζώτου (3.9) και η φιάλη απομακρύνεται από τον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ο παραμένων διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (3.9) και το υπόλειμμα διαλύεται αμέσως σε γνωστό όγκο (10-100 ml) μεθανόλης (3.3) (η συγκέντρωση της DL-α-τοκοφερόλης πρέπει να είναι της τάξεως των 5 IU/ml έως 30 µg/ml).

5.5. *Προσδιορισμός με HPLC*

Η βιταμίνη Ε διαχωρίζεται σε στήλη ανάστροφης φάσης C₁₈ (4.5.1) και μετράται η συγκέντρωση με τη βοήθεια ανιχνευτή φθορισμού (διέγερση: 295 nm, εκπομπή: 330 nm) ή UV (292 nm) (4.5.2).

▼B

Εγχύεται κατάλληλη ποσότητα (π.χ. 20 µl) του μεθανολικού διαλύματος που λαμβάνεται στην παράγραφο 5.4 και εκλούζεται με την κινητή φάση (3.8). Υπολογίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) ορισμένων εγχύσεων του ίδιου δείγματος και τα μέσα ύψη κορυφών (εμβαδά) ορισμένων εγχύσεων των διαλυμάτων βαθμονόμησης (5.6.2).

Συνθήκες HPLC

Για την HPLC πρέπει να χρησιμοποιούνται οι κατωτέρω συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν όμως και άλλες συνθήκες υπό την προϋπόθεση ότι παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Υγρή χρωματογραφική στήλη (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , 5 ή 10 µm πλήρωση ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.8):	Μείγμα μεθανόλης (3.3) και νερού π.χ. 980 + 20 (v + v).
Ρυθμός ροής:	1-2 ml/min
Ανιχνευτής (4.5.2)	Ανιχνευτής φθορισμού (διέγερση: 295 nm/εκπομπή: 330 nm) ή ανιχνευτής UV (292 nm)

5.6. Βαθμονόμηση (οξική DL-α-τοκοφερόλη ή DL-α-τοκοφερόλη)

5.6.1. Πρότυπο οξικής DL-α-τοκοφερόλης

5.6.1.1. Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας

Σε κωνική ή σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 500 ml (4.2.1) μεταφέρονται με σιφόνιο 25 ml του αρχικού διαλύματος οξικής DL-α-τοκοφερόλης (3.10.1) και υδρολύεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2. Ακολουθεί εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (3.2) σύμφωνα με την παράγραφο 5.3 και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή των 500 ml με πετρελαϊκό αιθέρα. 25 ml του εκχυλίσματος αυτού εξατμίζονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (βλέπε παράγραφο 5.4) σχεδόν μέχρι ξηρού, ο εναπομένον διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (3.9) και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 25,0 ml μεθανόλης (3.3). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 45,5 µg οξικής DL-α-τοκοφερόλης ανά ml. Το πρότυπο διάλυμα εργασίας πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

5.6.1.2. Παρασκευή των διαλυμάτων και καμπύλη βαθμονόμησης

1,0, 2,0, 4,0 και 10,0 ml του πρότυπου διαλύματος εργασίας μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 20 ml, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.3) και αναμειγνύονται. Οι ονομαστικές περιεκτικότητες των διαλυμάτων αυτών είναι 2,5, 5,0, 10,0 και 25,0 µg/ml σε οξική DL-α-τοκοφερόλη, δηλαδή 2,28, 4,55, 9,10 και 22,8 µg/ml DLα-τοκοφερόλη.

20 µl κάθε διαλύματος βαθμονόμησης εγχύνονται κατ' επανάληψη και προσδιορίζονται τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών. Χρησιμοποιώντας τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών, χαράσσεται καμπύλη βαθμονόμησης.

5.6.1.3. Τυποποίηση σε UV του αρχικού διαλύματος οξικής DL-α-τοκοφερόλης (3.10.1)

5,0 ml του αρχικού διαλύματος οξικής DL-α-τοκοφερόλης (3.10.1) αραιώνονται στα 25,0 ml με αιθανόλη και μετράται το υπεριώδες φάσμα του διαλύματος αυτού σε σχέση με την αιθανόλη (3.1) στο φασματοφωτόμετρο (4.6) μεταξύ 250 nm και 320 nm.

Το μέγιστο της απορρόφησης πρέπει να είναι στα 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ στα } 284 \text{ nm σε αιθανόλη}$$

Στην αραιώση αυτή πρέπει να ληφθεί τιμή απόσβεσης 0,84 έως 0,88.

▼B**5.6.2. Πρότυπο DL-α-τοκοφερόλης****5.6.2.1. Παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εργασίας**

Σε ογκομετρική φιάλη 50 ml μεταφέρονται με σιφόνιο 2 ml του αρχικού διαλύματος DL-α-τοκοφερόλης (3.11.1), διαλύονται σε μεθανόλη (3.3) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 40 μg DL-α-τοκοφερόλης ανά ml, ισοδύναμη με 44,0 μg οξικής DL-α-τοκοφερόλης ανά ml. Το πρότυπο διάλυμα εργασίας πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

5.6.2.2. Παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και καμπύλη βαθμονόμησης

1,0, 2,0, 4,0 και 10,0 ml του πρότυπου διαλύματος εργασίας μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 20 ml, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.3) και αναμειγνύονται. Οι ονομαστικές περιεκτικότητες των διαλυμάτων αυτών είναι 2,0, 4,0, 8,0 και 20,0 μg/ml σε DL-α-τοκοφερόλη, δηλαδή 2,20, 4,40, 8,79 και 22,0 μg/ml σε οξική DL-α-τοκοφερόλη.

20 ml κάθε διαλύματος βαθμονόμησης εγχύνονται κατ' επανάληψη και προσδιορίζονται τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών. Χρησιμοποιώντας τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών, χαράσσεται καμπύλη βαθμονόμησης.

5.6.2.3. Τυποποίηση σε UV του αρχικού διαλύματος DL-α-τοκοφερόλης (3.11.1)

2,0 ml του αρχικού διαλύματος DL-α-τοκοφερόλης (3.11.1) αραιώνονται στα 25,0 ml με αιθανόλη και μετράται το υπεριώδες φάσμα του διαλύματος αυτού σε σχέση με αιθανόλη (3.1) στο φασματοφωτόμετρο (4.6) μεταξύ 250 nm και 320 nm. Το μέγιστο της απορρόφησης πρέπει να είναι στα 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ στα } 292 \text{ nm σε αιθανόλη}$$

Στην αραιώση αυτή πρέπει να λαμβάνεται τιμή απόσβεσης 0,6.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της βιταμίνης E του δείγματος προσδιορίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε μg/ml (ως οξική DL-α-τοκοφερόλη) με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης (5.6.1.2 ή 5.6.2.2).

Η συγκέντρωση w της βιταμίνης E σε mg/kg του δείγματος δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

στον οποίο:

c = συγκέντρωση βιταμίνης E (με τη μορφή οξικής α-τοκοφερόλης) στο δείγμα (5.4) σε μg/ml

V₁ = όγκος του δείγματος (5.4) σε ml

V₂ = όγκος της ποσότητας που λαμβάνεται στην παράγραφο 5.4 σε ml

m = βάρος της προς δοκιμή ποσότητας σε g

7. Παρατηρήσεις

7.1. Σε δείγματα με χαμηλή συγκέντρωση βιταμίνης E, για τον προσδιορισμό με HPLC ενδέχεται να προσφέρεται περισσότερο η συνένωση των πετρελαϊκών εκχυλισμάτων δύο σαπωνοποιήσεων (ζυγισθείσα ποσότητα: 25 g) σε ένα δείγμα.

7.2. Το βάρος του δείγματος που λαμβάνεται για την ανάλυση δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 2 g λίπους.

7.3. Εάν δεν επέλθει διαχωρισμός φάσεων, προστίθενται 10 ml περίπου αιθανόλης (3.1) για διάσπαση του γαλακτώματος.

▼B

- 7.4. Μετά την φασματοφωτομετρική μέτρηση του διαλύματος της οξικής DL-α-τοκοφερόλης ή DL-α-τοκοφερόλης σύμφωνα με τις παραγράφους 5.6.1.3 ή 5.6.2.3 αντιστοίχως, προστίθενται περίπου 10 mg BHT (3.12) στο διάλυμα (3.10.1 ή 3.10.2) και το διάλυμα διατηρείται σε ψυγείο (μέγιστος χρόνος αποθήκευσης τέσσερις εβδομάδες).
- 7.5. Αντί BHT, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδροκινόνη.
- 7.6. Χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης είναι εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλης.
- 7.7. Αντί διαλύματος ασκορβικού νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 150 mg ασκορβικού οξέος.
- 7.8. Αντί διαλύματος θειούχου νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 50 mg EDTA.
- 7.9. Η οξική βιταμίνη E υδrolύεται πολύ γρήγορα υπό αλκαλικές συνθήκες και επομένως είναι πολύ ευαίσθητη στην οξείδωση, ιδιαίτερα παρουσία ιχνοστοιχείων όπως ο σίδηρος ή ο χαλκός. Στην περίπτωση προσδιορισμού βιταμίνης E σε προμείγματα, σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 5 000 mg/kg, μπορεί να προκύψει αποδόμηση της βιταμίνης E. Συνεπώς, για επιβεβαίωση, συνιστάται μια μέθοδος HPLC η οποία περιλαμβάνει ενζυματική χώνευση της σχηματιζόμενης βιταμίνης E χωρίς το βήμα της αλκαλικής σαπωνοποίησης.
8. **Επαναληψιμότητα**
- Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα πραγματοποιούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 % σε σχέση με το υψηλότερο αποτέλεσμα.
9. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης ⁽¹⁾**

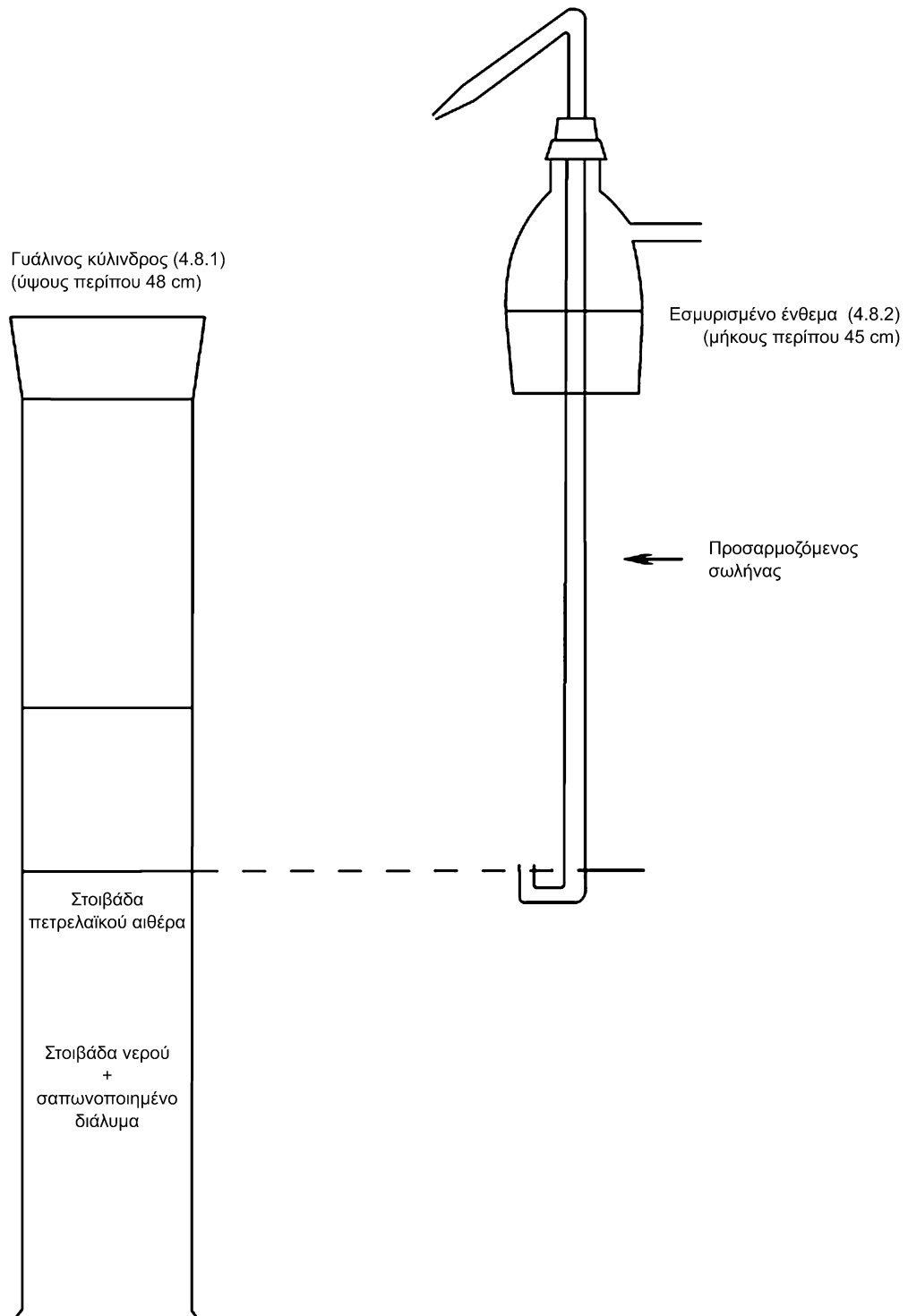
	Πρόμεγμα	Πρόμεγμα ζωοτροφής	Συμπύκνωμα ανόργανων υλικών	Πρωτεϊνούχος ζωοτροφή	Ζωοτροφή για χοιρίδια
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Μέσος όρος [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = αριθμός εργαστηρίων
n = αριθμός μεμονωμένων τιμών
s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
s_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
r = επαναληψιμότητα
R = αναπαραγωγιμότητα
CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας
CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

⁽¹⁾ Πραγματοποιήθηκε από την ομάδα εργασίας για τις ζωοτροφές του Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Σχήμα 1: Συσκευή εκχύλισης (4.8)



▼ B

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ, ΧΑΛΚΟΥ, ΜΑΓΓΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των ιχνοστοιχείων σιδήρου, χαλκού, μαγγανίου και ψευδαργύρου στις ζωοτροφές. Τα όρια προσδιορισμού είναι:

- σίδηρος (Fe): 20 mg/kg
- χαλκός (Cu): 10 mg/kg
- μαγγάνιο (Mn): 20 mg/kg
- ψευδάργυρος (Zn): 20 mg/kg

2. Βασική αρχή

Το δείγμα διαλύεται σε υδροχλωρικό οξύ μετά την καταστροφή της οργανικής ύλης, αν υπάρχει. Τα στοιχεία σιδήρου, χαλκού, μαγγανίου και ψευδαργύρου προσδιορίζονται, μετά από κατάλληλη αραίωση, με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

3. Αντιδραστήρια

Εισαγωγικές παρατηρήσεις

Για την παρασκευή των αντιδραστηρίων και των αναλυτικών διαλυμάτων χρησιμοποιείται νερό απαλλαγμένο από τα κατιόντα που πρόκειται να προσδιορισθούν, που λαμβάνεται είτε με διπλή απόσταξη νερού σε αποστακτήρα από βοριοπυριτική ύαλο ή από χαλαζία είτε με διπλή επεξεργασία με ρητίνες ανταλλαγής ιόντων.

Τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι τουλάχιστον αναλυτικής ποιότητας. Η καθαρότητα από τα στοιχεία που πρόκειται να προσδιορισθούν πρέπει να ελέγχεται με τυφλό πείραμα. Αν απαιτείται, τα αντιδραστήρια πρέπει να καθαρίζονται επιπλέον.

Σε αντικατάσταση των πρότυπων διαλυμάτων που περιγράφονται κατωτέρω, πρότυπα διαλύματα του εμπορίου μπορεί να χρησιμοποιηθούν με την προϋπόθεση ότι είναι εγγυημένα και έχουν ελεγχθεί πριν από τη χρήση.

- 3.1. Υδροχλωρικό οξύ (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Υδροχλωρικό οξύ (6 mol/litre).
- 3.3. Υδροχλωρικό οξύ (0,5 mol/litre).
- 3.4. Υδροφθορικό οξύ 38 μέχρι 40 % (κατ' όγκο) που έχει περιεκτικότητα σιδήρου λιγότερο από 1 mg Fe/lit και ίζημα μετά από εξάτμιση, λιγότερο από 10 mg (ως θειικό άλας)/lit.
- 3.5. Θειικό οξύ (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Υπεροξειδίου του υδρογόνου (περίπου 100 όγκοι οξυγόνου 30 % κατά βάρος).
- 3.7. Πρότυπο διάλυμα σιδήρου (1 000 µg Fe/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο: διαλύεται 1 gr σύρματος σιδήρου σε 200 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2), προστίθενται 16 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (3.6) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.
- 3.7.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας σιδήρου (100 µg Fe/ml) που παρασκευάζεται με αραίωση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (3.7) με 9 μέρη νερό.
- 3.8. Πρότυπο διάλυμα χαλκού (1 000 µg Cu/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο:
 - διαλύεται 1 gr χαλκού υπό μορφή σκόνης σε 25 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2), προστίθενται 5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (3.6) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.
- 3.8.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας χαλκού (10 µg Cu/ml) παρασκευάζεται με αραίωση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (3.8) με 9 μέρη νερό και συνέχεια με αραίωση ενός μέρους του προκύπτοντος διαλύματος με 9 μέρη νερό.

▼B

3.9. Πρότυπο διάλυμα μαγγανίου (1 000 µg Mn/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο:

— διαλύεται 1 g μαγγανίου υπό μορφή σκόνης α.π. σε 25 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.

3.9.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας μαγγανίου (10 µg Mn/ml) που παρασκευάζεται με αραιώση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (3.9) με 9 μέρη νερό και συνέχεια με αραιώση ενός μέρους του προκύπτοντος διαλύματος με 9 μέρη νερό.

3.10. Πρότυπο διάλυμα ψευδαργύρου (1 000 µg Zn/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο:

— διαλύεται 1 g ψευδαργύρου υπό μορφή λωρίδος ή φύλλου σε 25 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.

3.10.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας ψευδαργύρου (10 µg Zn/ml) που παρασκευάζεται με αραιώση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (3.10) με 9 μέρη νερό και συνέχεια με αραιώση ενός μέρους του προκύπτοντος διαλύματος με 9 μέρη νερό.

3.11. Διάλυμα χλωριούχου λανθανίου που παρασκευάζεται ως εξής: διαλύονται 12 g οξειδίου του λανθανίου σε 150 ml νερό, προστίθενται 100 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.

4. Όργανα

4.1. Φούρνος με διαφράγματα με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και καταγραφικό.

4.2. Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να είναι από ανθεκτικό πυριτικό βόριο. Συνιστάται η χρησιμοποίηση συσκευών αποκλειστικά για προσδιορισμούς ιχνοστοιχείων.

4.3. Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης ανταποκρινόμενο στις απαιτήσεις της μεθόδου όσον αφορά την ευαισθησία και την ακρίβεια στο απαιτούμενο εύρος της περιοχής μετρήσεων.

5. Μέθοδος ⁽¹⁾

5.1. Δείγματα που περιέχουν οργανική ύλη

5.1.1. Αποτέφρωση και παρασκευή του διαλύματος που θα αναλυθεί ⁽²⁾

5.1.1.1. Τοποθετούνται 5 ως 10 g του δείγματος ζυγισμένα με προσέγγιση 0,2 mg σε ένα χωνευτήρι από χαλαζία ή πλατίνα (βλέπε σημείωση β), ζηραίνονται σε φούρνο σε 105 °C και τοποθετείται το χωνευτήρι σε κρύο φούρνο με διαφράγματα (4.1). Κλείεται ο φούρνος [βλέπε σημείωση γ)] και προοδευτικά αυξάνεται η θερμοκρασία στους 450 μέχρι 475 °C μέσα σε 90 λεπτά περίπου. Διατηρείται αυτή η θερμοκρασία για 4 ως 16 ώρες (π.χ. κατά τη διάρκεια της νύχτας) ώστε να απομακρυνθεί η ανθρακώδης ύλη και στη συνέχεια ανοίγεται ο φούρνος και αφήνεται να κρυώσει (βλέπε σημείωση δ).

⁽¹⁾ Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες μέθοδοι χώνευσης, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι έχουν παρόμοια αποτελέσματα (όπως χώνευση υπό πίεση μικροκυμάτων).

⁽²⁾ Ο πράσινος σάνος (φρέσκος ή αποξηραμένος) ενδέχεται να περιέχει μεγάλες ποσότητες φυτικού διοξειδίου του πυριτίου, το οποίο μπορεί να συγκρατεί ιχνοστοιχεία και πρέπει να απομακρυνθεί. Για δείγματα προερχόμενα από τέτοιες ζωοτροφές πρέπει συνεπώς να ακολουθηθεί η επόμενη τροποποιημένη μέθοδος. Εκτελείται η εργασία της παραγράφου 5.1.1.1 μέχρι το στάδιο της διήθησης. Πλένεται το διηθητικό χαρτί που περιέχει το αδιάλυτο κατακράτημα, δύο φορές με βραστό νερό και τοποθετείται σε χωνευτήρι από χαλαζία ή πλατίνα. Αποτεφρώνεται μέσα στο φούρνο με διαφράγματα (4.1) σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 550 °C μέχρις ότου όλη η ανθρακώδης ύλη εξαφανισθεί τελείως. Αφήνεται να κρυώσει, προστίθενται μερικές σταγόνες νερού, μετά 10 ως 15 ml υδροφθορικού οξέος (3.4) και εξατμίζεται μέχρι ξηρού στους 150 °C περίπου. Αν παραμείνει ποσότητα διοξειδίου του πυριτίου στο υπόλειμμα, ξαναδιαλύεται σε μερικά ml υδροφθορικού οξέος (3.4) και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Προστίθενται πέντε σταγόνες θεικού οξέος (3.5) και θερμαίνεται μέχρι να σταματήσει η παραγωγή άσπρου καπνού. Μετά την προσθήκη 5 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) και περίπου 30 ml νερού, θερμαίνεται, δηλαδή το διάλυμα μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και συμπληρώνεται ο όγκος των 250 ml με νερό (η συγκέντρωση του HCl είναι περίπου 0,5 mol/l). Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία από την παράγραφο 5.1.2.

▼B

Η τέφρα υγραίνεται με νερό και μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml. Ξεπλένεται το χωνευτήρι με περίπου 5 ml συνολικά υδροχλωρικού οξέος (3.1) και στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα αυτό αργά και προσεκτικά στο δοχείο. (Πιθανόν να υπάρξει μια ισχυρή αντίδραση οφειλόμενη στο σχηματισμό CO_2). Προστίθεται υδροχλωρικό οξύ (3.1) κατά σταγόνες ανακατεύοντας ταυτόχρονα το περιεχόμενο του δοχείου, μέχρι να σταματήσει τελείως ο αναβρασμός. Εξατμίζεται μέχρι ξηρού, ανακατεύοντας κατά διαστήματα με γυάλινη ράβδο.

Στη συνέχεια προστίθενται 15 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) στο υπόλειμμα και κατόπιν περίπου 120 ml νερό. Αναδεύεται με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου, η οποία πρέπει να μείνει μέσα στο δοχείο και καλύπτεται το δοχείο με ύαλο ωρολογίου. Αυξάνεται σιγά-σιγά η θερμοκρασία στο σημείο βρασμού και διατηρείται στο σημείο αυτό μέχρις ότου δεν φαίνεται να διαλύεται άλλη στάχτη. Διηθείται με διηθητικό χαρτί καθαρό από στάχτες και συλλέγεται το διήθημα σε μία ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Πλένεται το δοχείο και το φίλτρο με 5 ml ζεστού υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2) και δύο φορές με βραστό νερό. Συμπληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με νερό μέχρι τα 250 ml (συγκέντρωση HCl περίπου 0,5 mol/litre).

- 5.1.1.2. Αν το υπόλειμμα στο φίλτρο εμφανίζεται μαύρο (κάρβουνο) τοποθετείται πάλι στο φούρνο και αποτεφρώνεται στους 450 ως 475 °C. Αυτή η αποτέφρωση, που απαιτεί μόνο λίγες ώρες (περίπου τρεις ως πέντε ώρες), ολοκληρώνεται όταν η στάχτη εμφανίζεται άσπρη ή σχεδόν άσπρη. Διαλύεται το υπόλειμμα με περίπου 2 ml υδροχλωρικού οξέος (3.1), εξατμίζεται μέχρι του ξηρού και προστίθενται 5 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (3.2). Θερμαίνεται, διηθείται το διάλυμα μέσα στην ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 250 ml (συγκέντρωση HCl περίπου 0,5 mol/litre).

Σημειώσεις:

- α) Στον προσδιορισμό των ιχνοστοιχείων πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στους κινδύνους μόλυνσης, ιδιαίτερα από τον ψευδάργυρο, το χαλκό και το σίδηρο. Γι' αυτό το λόγο ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των δειγμάτων πρέπει να είναι καθαρός από αυτά τα μέταλλα.

Για να μειωθεί ο γενικότερος κίνδυνος μόλυνσης, η εργασία πρέπει να γίνεται σε ατμόσφαιρα ελεύθερη από σκόνη με πάρα πολύ καθαρό εξοπλισμό και προσεκτικά πλυμένα γυάλινα σκεύη. Ο προσδιορισμός του ψευδαργύρου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε πολλούς τύπους μόλυνσης, π.χ. από γυάλινα σκεύη, αντιδραστήρια, σκόνη κ.λπ.

- β) Το βάρος του δείγματος που πρόκειται να αποτεφρωθεί υπολογίζεται από την κατά προσέγγιση περιεκτικότητα του ιχνοστοιχείου στη ζωοτροφή σε σχέση με την ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου που χρησιμοποιήθηκε. Για μερικές ζωοτροφές φτωχές σε ιχνοστοιχεία μπορεί να είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν αρχικά 10 ως 20 g δείγματος και να περιορίζεται ο όγκος του τελικού διαλύματος στα 100 ml.

- γ) Η αποτέφρωση πρέπει να γίνει σε κλειστό φούρνο χωρίς έγχυση αέρα ή οξυγόνου.

- δ) Η θερμοκρασία που δείχνει το πυρόμετρο δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 475 °C.

5.1.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

5.1.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων βαθμονόμησης

Για καθένα από τα στοιχεία που πρόκειται να προσδιορισθούν, παρασκευάζεται από τα πρότυπα διαλύματα εργασίας που δόθηκαν στις παραγράφους 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 και 3.10.1 μια σειρά από διαλύματα βαθμονόμησης, έτσι ώστε κάθε διάλυμα βαθμονόμησης να έχει συγκέντρωση HCl περίπου 0,5 mol/litre και (στις περιπτώσεις σιδήρου, μαγνητίου και ψευδαργύρου) συγκέντρωση χλωριούχου λανθανίου ισοδύναμη με 0,1 % La (βάρος/όγκο).

Οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων που διαλέχθηκαν πρέπει να βρίσκονται μέσα στα όρια ευαισθησίας του φασματοφωτομέτρου που χρησιμοποιήθηκε. Οι παρακάτω πίνακες δείχνουν, ως παράδειγμα, τις συνθέσεις των τυπικού εύρους των διαλυμάτων βαθμονόμησης. Εντούτοις, ανάλογα με τον τύπο και την ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου που χρησιμοποιείται, μπορεί να είναι απαραίτητη η επιλογή άλλων συγκεντρώσεων.

▼B**Σίδηρος**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml							

Χαλκός

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Μαγγάνιο

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml							

Ψευδάργυρος

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml							

5.1.2.2. Παρασκευή των διαλυμάτων για ανάλυση

Για τον προσδιορισμό του χαλκού, το διάλυμα που παρασκευάστηκε από την παράγραφο 5.1.1 μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί άμεσα. Αν απαιτείται να προσαρμοσθεί η συγκέντρωσή του μέσα στα όρια των διαλυμάτων βαθμονόμησης, μπορεί ένα μέρος του διαλύματος να μεταφερθεί με πιπέτα σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 ml και να συμπληρωθεί με 0,5 mol/litre υδροχλωρικό οξύ (3.3) μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 100 ml.

Για τον προσδιορισμό του σιδήρου, μαγγανίου και ψευδαργύρου μεταφέρεται με πιπέτα ένα μέρος του διαλύματος που παρασκευάστηκε από την παράγραφο 5.1.1 μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, προστίθενται 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11) και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ 0,5 mol/litre (3.3) (βλέπε επίσης παράγραφο 8 «Παρατήρηση»).

5.1.2.3. Τυφλό πείραμα

Το τυφλό πείραμα πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα προβλεπόμενα στάδια της διαδικασίας, παραλειπομένου του υλικού του δείγματος. Το διάλυμα βαθμονόμησης «0» δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως «τυφλό πείραμα».

5.1.2.4. Μέτρηση της ατομικής απορρόφησης

Μετράται η ατομική απορρόφηση των διαλυμάτων βαθμονόμησης και του διαλύματος που πρόκειται να αναλυθεί χρησιμοποιώντας μια οξειδωτική φλόγα αέρα-ακετυλενίου στα ακόλουθα μήκη κύματος:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼ B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Κάθε μέτρηση γίνεται τέσσερις φορές.

5.2. *Ανόργανα υλικά*

Αν το δείγμα δεν περιέχει οργανική ύλη, δεν είναι απαραίτητη προηγούμενη αποτέφρωση. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.1.1.1 αρχίζοντας από τη δεύτερη υποπαράγραφο. Η εξάτμιση με υδροφθορικό οξύ μπορεί να παραλειφθεί.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται η συγκέντρωση του ιχνοστοιχείου στο δείγμα που αναλύεται και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg ιχνοστοιχείου ανά kg δείγματος (ppm).

7. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα δύο παράλληλα πραγματοποιούμενων προσδιορισμών, που εκτελέστηκαν στο ίδιο δείγμα από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

- τα 5 mg/kg, κατ' απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου μέχρι 50 mg/kg,
- το 10 % του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου από 50 και μέχρι 100 mg/kg,
- τα 10 mg/kg, με απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου 100 και μέχρι 200 mg/kg,
- το 5 % του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου ανώτερες από 200 mg/kg.

8. **Παρατήρηση**

Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων φωσφορικών αλάτων μπορεί να προκαλέσει παρεμβολές στον προσδιορισμό του σιδήρου, μαγγανίου και ψευδαργύρου. Αυτή η παρεμβολή πρέπει να διορθωθεί με την προσθήκη διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11). Αν όμως στο δείγμα ο λόγος βάρους Ca + Mg/P είναι > 2, η προσθήκη του διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (3.11) στο διάλυμα που θα αναλυθεί και στα διαλύματα βαθμονόμησης μπορεί να παραλειφθεί.

Δ. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΟΦΟΥΓΙΝΟΝΗΣ

Υδροβρωμική DL-trans-7-βρωμο-6-χλωρο-3-[3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ)-ακετονυλο]-κιναιζολινόνη-4-(3H)

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλοφουγινόνης στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 1 mg/kg.

2. **Αρχή**

Μετά από κατεργασία του δείγματος με θερμό νερό, η αλοφουγινόνη εκχυλίζεται ως ελεύθερη βάση σε οξικό αιθυλεστέρα και, κατόπιν, κατανέμεται ως υδροχλωρικό άλας σε υδατικό διάλυμα οξέος. Το εκχύλισμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Η περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνη προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), ανεστραμμένης φάσης, με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

- 3.1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC
- 3.2. Ρητίνη Amberlite XAD-2
- 3.3. Οξικό αμμώνιο
- 3.4. Οξικός αιθυλεστέρας
- 3.5. Κρυσταλλικό οξικό οξύ

▼B

3.6. Αλοφουγινόνη, πρότυπη ουσία (υδροβρωμική DL-trans-7-βρωμο-6-χλωρο-3-[3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ] ακετονυλο]-κιναζολινόνη-4-(3H), E 764)

3.6.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αλοφουγινόνης, συγκέντρωσης, 100 µg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg αλοφουγινόνης (3.6) και διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (3.18). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και ακολουθεί ανάμειξη. Το διάλυμα αυτό διατηρείται σταθερό επί τρεις εβδομάδες στους 5 °C, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι.

3.6.2. Διαλύματα αναφοράς

Σε σειρά ογκομετρικών φιαλών των 100 ml, μεταφέρονται 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 και 6,0 ml από το αρχικό πρότυπο διάλυμα (3.6.1). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα της κινούμενης φάσης (3.21) και ακολουθεί ανάμειξη. Τα διαλύματα αυτά, που πρέπει να παρασκευάζονται πριν από κάθε χρήση, έχουν συγκέντρωση αλοφουγινόνης 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 και 6,0 µg/ml αντίστοιχα.

3.7. Υδροχλωρικό οξύ (ρ_{20} περίπου 1,16 g/ml).

3.8. Μεθανόλη

3.9. Νιτρικός άργυρος

3.10. Ασκορβικό νάτριο

3.11. Ανθρακικό νάτριο

3.12. Χλωριούχο νάτριο

3.13. EDTA (δινάτριο άλας του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος)

3.14. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.15. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου, c = 10 g/100 ml

3.16. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου κορεσμένο σε χλωριούχο νάτριο, c = 5 g/100 ml

Διαλύονται σε νερό 50 g ανθρακικού νατρίου (3.11). Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο και προστίθεται χλωριούχο νάτριο (3.12) μέχρι κορεσμού.

3.17. Υδροχλωρικό οξύ περίπου 0,1 mol/l

10 ml HCl (3.7) αραιώνονται με νερό μέχρι το 1 λίτρο.

3.18. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου περίπου 0,25 mol/l

Διαλύονται σε νερό (3.14) 19,3 gr οξικού αμμωνίου (3.3) και 30 ml οξικού οξέος (3.5) και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

3.19. Προετοιμασία της ρητίνης Amberlite XAD-2

Κατάλληλη ποσότητα ρητίνης Amberlite (3.2) εκπλύνεται με νερό μέχρι να απομακρυνθούν τελείως τα χλωριόντα, πράγμα που αποδεικνύεται με τη διεξαγωγή δοκιμής νιτρικού αργύρου (3.20) στην απορριπτόμενη υδατική φάση. Στη συνέχεια, η ρητίνη εκπλύνεται με 50 ml μεθανόλης (3.8), απορρίπτεται η μεθανόλη και η ρητίνη φυλάσσεται σε ανανεωμένη μεθανόλη.

3.20. Διάλυμα νιτρικού αργύρου περίπου 0,1 mol/l

Διαλύονται 0,17 gr νιτρικού αργύρου (3.9) σε 10 ml νερού.

3.21. Κινούμενη φάση για τη χρωματογραφία HPLC

Αναμειγνύονται 500 ml ακετονιτριλίου (3.1) με 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου (3.18) και 1 200 ml νερού (3.14). Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 4,3 με τη βοήθεια οξικού οξέος (3.5). Το διάλυμα διηθείται με ηθμό των 0,22 µm (4.8) και κατόπιν υποβάλλεται σε απαερίωση (παραδείγματος χάρι, με έκθεση σε υπερήχους επί δέκα λεπτά). Το διάλυμα αυτό διατηρείται σταθερό επί ένα μήνα, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι σε κλειστό δοχείο.

▼ B**4. Όργανα**

- 4.1. Λουτρό υπερήχων
- 4.2. Περιστρεφόμενος εξατμιστής υμενίου
- 4.3. Φυγόκεντρος
- 4.4. Εξοπλισμός HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών
 - 4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με πληρωτικό υλικό C₁₈ πάχους 10 μm ή ισοδύναμη
- 4.5. Γυάλινη στήλη (διαστάσεων 300 mm × 10 mm) εφοδιασμένη με ηθμό από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα
- 4.6. Ηθμοί από υαλοβάμβακα, διαμέτρου 150 mm
- 4.7. Διηθητικές μεμβράνες των 0,45 μm
- 4.8. Διηθητικές μεμβράνες των 0,22 μm

5. Διαδικασία

Σημείωση: Η αλοφουγινόνη ως ελεύθερη βάση είναι ασταθής σε αλκαλικά διαλύματα και διαλύματα οξικού αιθυλεστέρα. Δεν πρέπει να παραμένει μέσα σε οξικό αιθυλεστέρα περισσότερο από 30 λεπτά.

5.1. Γενικά

- 5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σ' αυτό αλοφουγινόνη ή παρεμποδίζουσες ουσίες.
- 5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναληφθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής, το οποίο θα έχει εμπλουτισθεί με ποσότητα αλοφουγινόνης όμοια με αυτήν που υπάρχει στο προς ανάλυση δείγμα. Για τον εμπλουτισμό σε επίπεδο 3 mg/Kg προστίθενται 300 μl από το αρχικό πρότυπο διάλυμα (3.6.1) σε 10 gr τυφλού δείγματος ζωοτροφής και αφού αναμειχθεί αφήνεται δέκα λεπτά πριν από το επόμενο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Σημείωση: Για το σκοπό αυτής της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με το δείγμα και δεν πρέπει να ανιχνευθεί αλοφουγινόνη.

5.2. Εκχύλιση

Σε σωλήνα φυγόκεντρου των 200 ml, ζυγίζονται 10 gr του παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,1 gr και προστίθενται 0,5 gr ασκορβικού νατρίου (3.10), 0,5 gr EDTA (3.13) και 20 ml νερού. Το σύνολο αναμειγνύεται και ο σωλήνας τοποθετείται επί 5 λεπτά σε υδατόλουτρο (80 °C). Αφού ψυχθεί μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 20 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (3.15) και ακολουθεί ανάμειξη. Προστίθενται αμέσως 100 ml οξικού αιθυλεστέρα (3.4) και το σύνολο αναδεύεται ζωηρά επί 15 δευτερόλεπτα με το χέρι. Στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται επί τρία λεπτά στο λουτρό υπερήχων (4.1) και χαλαρώνεται το πάμα. Ακολουθεί φυγόκεντρωση επί δύο λεπτά. Η στιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα αποχύνεται, μέσω ηθμού από υαλοβάμβακα (4.6), μέσα σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση του δείγματος με νέα ποσότητα 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα ενώνονται, εκκλύονται επί ένα λεπτό με 50 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου κορεσμένου με χλωριούχο νάτριο (3.16) και η υδατική στιβάδα απορρίπτεται.

Η οργανική στιβάδα υποβάλλεται σε εκχύλιση επί ένα λεπτό με 50 ml υδροχλωρικού οξέος (3.17). Η υποκείμενη στιβάδα του οξέος συλλέγεται γρήγορα σε διαχωριστική χοάνη των 250 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της οργανικής στιβάδας επί 1,5 λεπτό με νέα ποσότητα 50 ml υδροχλωρικού οξέος και τα δύο εκχυλίσματα ενώνονται. Εκκλύονται με περιδίνηση επί δέκα δευτερόλεπτα περίπου με 10 ml οξικού αιθυλεστέρα (3.4).

▼B

Η υδάτινη στιβάδα μεταγγίζεται ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, ενώ η οργανική στιβάδα απορρίπτεται. Η εναπομένουσα ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα εξατμίζεται πλήρως από το διάλυμα του οξέος σε περιστρεφόμενο εξατμιστή υμενίου (4.2). Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C. Αν η συσκευή βρίσκεται υπό κενό περίπου 25 mbar και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 38 °C, όλη η εναπομένουσα ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα απομακρύνεται σε πέντε λεπτά.

5.3. Καθαρισμός

5.3.1. Παρασκευή της στήλης Amberlite

Παρασκευάζεται μία στήλη XAD-2 για κάθε εκχύλισμα δείγματος. Με τη βοήθεια μεθανόλης (3.8) φέρονται σε γυάλινη στήλη (4.5) 10 gr έτοιμης προς χρήση Amberlite (3.9). Στην άνω επιφάνεια της ρητίνης τοποθετείται μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα. Η μεθανόλη απορροφάται από τη στήλη και η ρητίνη εκπλύνεται με 100 ml νερού, μέχρι το υγρό να φθάσει στην άνω επιφάνεια της ρητίνης, οπότε διακόπτεται η ροή. Πριν χρησιμοποιηθεί, η στήλη αφήνεται σε ηρεμία επί δέκα λεπτά για να αποκατασταθεί ισορροπία. Η στήλη δεν πρέπει ποτέ να αφήνεται να ξηρανθεί.

5.3.2. Καθαρισμός του δείγματος

Το εκχύλισμα (5.2) μεταγγίζεται ποσοτικά στο άνω μέρος της έτοιμης προς χρήση στήλης Amberlite (5.3.1) και ακολουθεί έκλουση με απόρριψη του εκλούσματος. Η ταχύτητα έκλουσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 ml/min. Η σφαιρική φιάλη εκπλύνεται με 20 ml υδροχλωρικού οξέος (3.17) και το έκπλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την έκπλυση της ρητινικής στήλης. Στα τυχόν υπολείμματα διαλύματος του οξέος διοχετεύεται ρεύμα αέρος. Τα υγρά της έκπλυσης απορρίπτονται. Προστίθενται στη στήλη 100 ml μεθανόλης (3.8) και αφήνονται να εκρεύσουν 5-10 ml και το έκλουσμα συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml. Η εναπομένουσα μεθανόλη αφήνεται σε ηρεμία επί δέκα λεπτά για να αποκατασταθεί ισορροπία με τη ρητίνη και συνεχίζεται η έκλουση με ταχύτητα όχι μεγαλύτερη από 20 ml/min, ενώ το έκλουσμα συλλέγεται στην ίδια σφαιρική φιάλη. Η μεθανόλη εξατμίζεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστή υμενίου (4.2), θερμαινόμενο σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C. Το υπόλειμμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml με τη βοήθεια του διαλύματος της κινούμενης φάσης (3.21). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με την κινούμενη φάση και το σύνολο αναμειγνύεται. Μια ορισμένη ποσότητα διηθείται διαμέσου διηθητικής μεμβράνης (4.7). Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (5.4).

5.4. Ποσοτικός προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC

5.4.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες συνθήκες δίδονται μόνο ως οδηγός. Άλλες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, υπό την προϋπόθεση να δίδουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Στήλη αναλυτικής χρωματογραφίας (4.4.1)

Κινούμενη φάση (3.21)

Ταχύτητα ροής: 1,5 έως 2 ml/min.

Μήκος κύματος ανιχνευτή: 243 nm

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 40 έως 100 µl.

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (3.6.2) που περιέχει 3,0 µg/ml, μέχρι να επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα αναφοράς (3.6.2) εισάγεται πολλές φορές στη στήλη και μετρώνται τα ύψη (ή τα εμβαδά) των κορυφών που αντιστοιχούν σε κάθε συγκεντρώση. Σχεδιάζεται καμπύλη αναφοράς με τεταγμένη τις μέσες τιμές των υψών ή των εμβαδών των κορυφών που λαμβάνονται για διαλύματα αναφοράς και τεταγμένη τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε µg/ml.

▼B**5.4.3. Διάλυμα δείγματος**

Το εκχύλισμα του δείγματος (5.3.2), σε όγκο ίσο με εκείνου που έχει χρησιμοποιηθεί για τα διαλύματα αναφοράς, εισάγεται πολλές φορές στη στήλη και υπολογίζεται η μέση τιμή των υψών ή των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στην αλοφουγινόνη.

6. Έκφραση των αποτελεσμάτων

Από τις μέσες τιμές των υψών (εμβαδών) των κορυφών που αντιστοιχούν στην αλοφουγινόνη του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του σε/ml με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε αλοφουγινόνη κατά βάρος (mg/kg) παρέχεται από τον τύπο:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

όπου:

c = συγκέντρωση αλοφουγινόνης στο διάλυμα δείγματος σε mg/ml,
m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε γραμμάρια.

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων**7.1. Ταυτότητα**

Η ταυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογράφιση ή με ανιχνευτή συστοιχίας δίδων λυχνιών, με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (3.6.2) με συγκέντρωση 6,0 mg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογράφιση

Το εκχύλισμα δείγματος εμπλουτίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος αναφοράς (3.6.2). Η ποσότητα της προστιθέμενης αλοφουγινόνης πρέπει να είναι παραπλήσια με την υπολογισθείσα ποσότητα της ουσίας στο εκχύλισμα του δείγματος.

Πρέπει να προκύψει ενίσχυση μόνο του ύψους της κορυφής που αντιστοιχεί στην αλοφουγινόνη, αφού ληφθεί υπόψη και το ποσό που προστέθηκε και η αραίωση του εκχυλίσματος. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ του μέγιστου ύψους της δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από $\pm 10 \%$ του αρχικού εύρους.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχία δίδων λυχνιών

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι τα ίδια, εντός ορίων που καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα του ανιχνευτή. Για την ανίχνευση σε συστοιχία δίδων λυχνιών, το όριο αυτό είναι συνήθως $\pm 2 \text{ nm}$.
- β) σε μήκος κύματος μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα που αντιστοιχούν στο δείγμα και στο πρότυπο διάλυμα, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για εκείνα τα μέρη του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο παρατήρησης η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης ελεγχόμενης ουσίας.
- γ) σε μήκος κύματος μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα των κορυφών που παράγονται από το εκχύλισμα του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους για εκείνα τα μέρη του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και όταν σε κανένα σημείο παρατήρησης η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος των κορυφών.

▼ B

Εάν ένα από τα κριτήρια αυτά δεν πληρούται, η παρουσία της ελεγχόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων ποσοτικών προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 mg/kg, για περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνη 3mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Για το εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, ο βαθμός ανάκτησης πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. **Αποτελέσματα συλλογικής μελέτης**

Εκπονήθηκε συλλογική μελέτη⁽¹⁾, κατά την οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση τρία δείγματα σε οκτώ εργαστήρια.

Αποτελέσματα

	Δείγμα Α (τυφλό) Κατά την παραλαβή	Δείγμα Β (Σιμιγδάλια)		Δείγμα Γ (Σύμπληκτα)	
		Κατά την παραλαβή	Μετά από δύο μήνες	Κατά την παραλαβή	Μετά από δύο μήνες
Μέσος όρος [mg/kg]	ΔΑ	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Ανάκτ. [%]		86	74	88	75

ΔΑ = δεν ανιχνεύθηκε

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας (%)

Rec = ανάκτηση (%).

Ε. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΟΒΕΝΙΔΙΝΗΣ

Υδροχλωρική 1,3-δισ[(4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο] γουανιδίνη

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της ροβενιδίνης στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 5 mg/kg.

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Το εκχύλισμα ξηραίνεται και μέρος αυτού υποβάλλεται σε καθαρισμό πάνω σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Η ροβενιδίνη εκλύεται από τη στήλη με μεθανόλη και φέρεται στον κατάλληλο όγκο με κινητή φάση. Η περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη προσδιορίζεται με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) ανάστροφης φάσης με τη βοήθεια ανιχνευτού υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**3.1. *Μεθανόλη*3.2. *Οξινισμένη μεθανόλη*

Εντός βαθμονομημένης φιάλης των 500 ml εισάγονται 4,0 ml υδροχλωρικού οξέος (ρ₂₀ = 1,18 g/ml), προστίθεται μεθανόλη (3.1) μέχρι τη χαραγή και το περιεχόμενο αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευασθεί λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, σσ. 1 252 έως 1 256.

▼B

- 3.3. *Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC*
- 3.4. *Μοριακό κόσκινο*
- Σφαιρίδια τύπου 3A, 8 έως 12 βρόχων (διάμετρος σφαιριδίων 1,6-2,5 mm, κρυσταλλικό πυριτικό αργίλιο, διάμετρος πόρων 0,3 nm).
- 3.5. *Οξείδιο του αργιλίου: όξινο, βαθμού ενεργότητας I για χρωματογραφία στήλης*
- Εισάγουμε 100 g οξειδίου του αργιλίου σε κατάλληλο δοχείο και προσθέτουμε 2,0 ml νερού. Πωματίζουμε και ανακινούμε επαρκώς επί 20 λεπτά. Φυλάσσουμε το διάλυμα σε καλά πωματισμένο δοχείο.
- 3.6. *Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου, $c = 0,025 \text{ mol/l}$*
- Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,40 g δισόξινου φωσφορικού καλίου εντός βαθμονομημένης φιάλης των 1 000 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.
- 3.7. *Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου, $c = 0,025 \text{ mol/l}$*
- Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,55 g άνδρου (ή 4,45 g δις ένδρου ή 8,95 g δωδεκάκις ένδρου) μονόξινου φωσφορικού νατρίου εντός βαθμονομημένης φιάλης του 1 λίτρου, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.
- 3.8. *Κινητή φάση HPLC*
- Αναμειγνύουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:
- 650 ml ακετονιτρίλιου (3.3),
- 250 ml νερού (καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC),
- 50 ml διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (3.6),
- 50 ml διαλύματος μονόξινου φωσφορικού νατρίου (3.7).
- Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης πάχους 0,22 μm (4.6) και απομακρύνονται τα αέρια (π.χ. με έκθεση σε υπερήχους επί 10 λεπτά).
- 3.9. *Πρότυπη ουσία*
- Καθαρή ροβενιδίνη: υδροχλωρική 1,3-δισ [4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο]γουανιδίνη.
- 3.9.1. *Αρχικό πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 300 $\mu\text{g/ml}$*
- Ζυγίζουμε 30 mg της πρότυπης ουσίας (3.9) με ακρίβεια 0,1 mg. Διαλύουμε σε οξινομένη μεθανόλη (3.2) εντός βαθμονομημένης φιάλης των 100 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και αναμειγνύουμε. Περιτυλίγουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.
- 3.9.2. *Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 12 $\mu\text{g/ml}$*
- Μεταφέρουμε 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.9.1) εντός βαθμονομημένης φιάλης των 250 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.8) και αναμειγνύουμε. Περιτυλίσσουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.
- 3.9.3. *Διαλύματα βαθμονόμησης*
- Μεταφέρουμε 5,0 ml 10,0 ml, 15,0 ml, 20,0 ml και 25,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.9.2) σε βαθμονομημένες φιάλες των 50 ml. Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.8) και αναμειγνύουμε. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε ροβενιδίνη είναι αντιστοίχως 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 και 6,0 $\mu\text{g/ml}$. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.
- 3.10. *Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC*

▼ B**4. Όργανα****4.1. Υάλινη στήλη**

Υάλινη στήλη φαιοκίτρινου χρώματος (όπως το χρώμα του ηλεκτρον), εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με δεξαμενή χωρητικότητας 150 ml περίπου, εσωτερικής διαμέτρου 10-15 mm και μήκους 250 mm.

4.2. Μηχανικό τάρακτρο (σέικερ) ή μαγνητικός αναδευτήρας.**4.3. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου.****4.4. Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με αντιστοιχία διόδων ως ανιχνευτή η οποία να λειτουργεί στην περιοχή 250-400 nm.****4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με πληρωτικό υλικό C₁₈ πάχους 10 μm ή ισοδύναμη****4.5. Διηθητικός χάρτης από ίνες υάλου (Whatman GF/A ή άλλων ισοδύναμου τύπου)****4.6. Διηθητικές μεμβράνες πάχους 0,22 μm****4.7. Διηθητικές μεμβράνες πάχους 0,45 μm****5. Διαδικασία**

Σημείωση: Η ροβενιδίνη παρουσιάζει ευαισθησία στο φως και γι' αυτό πρέπει σε όλες τις ενέργειες να χρησιμοποιούνται υάλινα σκεύη φαιοκίτρινου χρώματος.

5.1. Γενικά**5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σε αυτό ούτε ροβενιδίνη ούτε άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.****5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής (5.1.1) το οποίο θα έχει προηγουμένως εμπλουτιστεί με ποσότητα ροβενιδίνης παραπλήσια εκείνης του δείγματος. Για εμπλουτισμό μέχρι 60 mg/kg, μεταφέρουμε 3,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.9.1) σε κωνική φιάλη των 250 ml. Εξατμίζουμε το διάλυμα υπό ρεύμα αζώτου μέχρις ότου απομείνουν περί τα 0,5 ml. Προσθέτουμε 15 g του τυφλού δείγματος, αναμειγνύουμε και αναμένουμε επί 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στην εκχύλιση (5.2).**

Σημείωση: Για τους σκοπούς αυτής της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου προς εκείνον του δείγματος και κατά την ανάλυση δεν πρέπει να ανιχνεύεται ροβενιδίνη.

5.2. Εκχύλιση

Ζυγίζονται περί τα 15 g που παρασκευασθέντος δείγματος με προσέγγιση 0,01 g, εισάγονται σε κωνική φιάλη των 250 ml όπου και προστίθενται 100,0 ml οξινισμένης μεθανόλης (3.2). Πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται επί μία ώρα με τον αναδευτήρα (4.2). Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη από ίνες υάλου (4.5) και το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 150 ml. Προστίθενται 7,5 g από μοριακό κόκκινο (3.4), πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται το περιεχόμενο επί 5 λεπτά. Το παρασκεύασμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη από υάλινες ίνες και το λαμβανόμενο διάλυμα φυλάσσεται για το στάδιο διαχωρισμού (5.3).

5.3. Καθαρισμός**5.3.1. Προετοιμασία της στήλης οξειδίου και αργιλίου**

Μικρό βύσμα υαλοβάμβακος τοποθετείται στο κάτω μέρος μιας υάλινης στήλης (4.1) και συμπιέζεται με τη βοήθεια υάλινης ράβδου. Ζυγίζονται 11,0 g του παρασκευασθέντος οξειδίου του αργιλίου (3.5) και μεταφέρονται στη στήλη. Λαμβάνεται φροντίδα ώστε κατά το στάδιο αυτό η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα να περιορισθεί στο ελάχιστο. Χτυπάμε ελαφρά τη στήλη από το κάτω μέρος της ώστε να κατακαθίσει το οξείδιο του αργιλίου.

▼B**5.3.2. Καθαρισμός του δείγματος**

Με ένα σιφώνιο εισάγονται στη στήλη 5,0 ml από το εκχύλισμα που ελήφθη κατά το στάδιο 5.2. Φέρεται στο άκρο του σιφωνίου πλησίον του τοιχώματος της στήλης και το διάλυμα αφήνεται να απορροφηθεί από το οξείδιο του αργιλίου. Εκλούεται η ροβενιδίνη από τη στήλη με 100 ml μεθανόλης (3.1) σε ρυθμό ροής 2-3 ml/min και συλλέγεται το υγρό της έκλουσης σε σφαιρική φιάλη των 250 ml. Το διάλυμα μεθανόλης εξατμίζεται μέχρι πλήρους ξήρανσης σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα υμενίου (4.3). Το υπόλειμμα διαλύεται εκ νέου σε 3-4 ml κινητής φάσης (3.8) και μεταφέρεται ποσοτικά σε βαθμονομημένη φιάλη των 10 ml. Η φιάλη εκπλύνεται επανειλημμένως με 1-2 ml κινητής φάσης κάθε φορά και τα υπολείμματα των εκπλύσεων μεταφέρονται στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται ο ίδιος διαλύτης στη βαθμονομημένη φιάλη μέχρι τη χωρηγή και το περιεχόμενο της φιάλης αναμειγνύεται. Μέρος του τελευταίου διαλύματος διηθείται μέσω μεμβράνης των 0,45 μm (4.7) και φυλάσσεται για τον προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (5.4).

5.4. Προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC**5.4.1. Παράμετροι**

Οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες είναι απλώς ενδεικτικές- ισοδύναμα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν και υπό άλλες συνθήκες: Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.4.1),

Κινητή φάση HPLC (3.8),

Ρυθμός ροής: 1,5 έως 2 ml/min,

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 317 nm,

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 20 έως 50 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα της χρωματογραφικής διάταξης με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (3.9.3) συγκέντρωσης 3,6 μg/ml έως ότου επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Καμπύλη βαθμονόμησης

Εισάγεται κατ' επανάληψη καθένα από τα διαλύματα αναφοράς (3.9.3) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών (εμβαδά) για κάθε συγκέντρωση. Χαρασσεται η καμπύλη αναφοράς με τεταγμένες τις μέσες τιμές του ύψους των κορυφών ή τις μέσες τιμές των εμβαδών και με τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg ανά ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Εισάγεται κατ' επανάληψη στη στήλη το εκχύλισμα του δείγματος (5.3.2) σε όγκο ίσο με εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) των κορυφών που αντιστοιχούν στη ροβενιδίνη.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του δείγματος σε μg/ml με βάση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της ροβενιδίνης του διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ροβενιδίνη κατά βάρος (mg/kg) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

όπου:

c = συγκέντρωση της ροβενιδίνης στο διάλυμα του δείγματος, σε μg/ml,

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε γραμμάρια.

▼B**7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων****7.1. Ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας**

Η ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή με τη χρήση συστοιχίας διόδων ως ανιχνευτή με τον οποίο γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (3.9.3) συγκέντρωσης 6,0 µg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα του δείγματος εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος αναφοράς (3.9.3). Η ποσότητα της προστιθέμενης ροβενιδίνης πρέπει να είναι παραπλήσια προς την κατ' εκτίμηση υπολογιζόμενη ποσότητα ροβενιδίνης στο εκχύλισμα του δείγματος.

Αν συνεκτιμηθούν τόσο η ποσότητα που προστέθηκε όσο και η αραίωση του εκχυλίσματος, πρέπει να σημειωθεί ενίσχυση μόνον της κορυφής που αντιστοιχεί στη ροβενιδίνη. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ περίπου του μεγίστου ύψους αυτής πρέπει να κυμαίνεται κατά 10 % περίπου σε σχέση με το αρχικό εύρος.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχία διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) Τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα του δείγματος και στο φάσμα του προτύπου και τα οποία αντιστοιχούν στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα πρέπει να είναι τα ίδια, με μια διαφορά της οποίας τα όρια καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα της ανιχνευτικής διάταξης. Για ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό είναι ± 2 nm.
- β) Μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα τμήματα εκείνα του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης ανιχνευόμενης ουσίας.
- γ) Μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα, στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν το ένα από το άλλο για τα τμήματα εκείνα του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος.

Εάν έστω και ένα από τα ανωτέρω κριτήρια δεν πληρούται, τότε η παρουσία της ανιχνευόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωθείσα.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων ποσοτικών προσδιορισμών επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του αποτελέσματος με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη μεγαλύτερη από 15 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Για ένα εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 85 %.

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Διοργανώθηκε από την Κοινότητα η πραγματοποίηση διεργαστηριακής μελέτης κατά την οποία αναλύθηκαν 4 δείγματα ζωοτροφών για πουλερικά και κουνέλια, υπό τη μορφή αλεύρων ή μορφή συμπύκνων. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 12 εργαστήρια και κάθε δείγμα αναλύθηκε δύο φορές. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων είναι τα ακόλουθα:

▼B

	Ζωοτροφές για πουλερικά		Ζωοτροφές για κουνέλια	
	Άλευρα	Σύμπληκτα	Άλευρα	Σύμπληκτα
Μέσος όρος [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Ανάκτηση [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής μεταβολής της επαναληψιμότητας, %

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγικότητας, %.

ΣΤ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DICLAZURIL

(+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5-τετραϋδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζίν-2-υλο) φαινυλ]ακετονιτρίλιο

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του diclazuril σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 0,1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 0,5 mg/kg.

2. Αρχή

Μετά από προσθήκη εσωτερικού προτύπου, το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Στις ζωοτροφές, κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος καθαρίζεται σε φυσίγγιο εκχύλισης στερεάς φάσης C_{18} . Το diclazuril εκλύεται από το φυσίγγιο με μείγμα οξινισμένης μεθανόλης και νερού. Έπειτα από εξάτμιση, το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Στα προμείγματα, το εκχύλισμα εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Η περιεκτικότητα σε diclazuril προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσης τριών διαλυμάτων βαθμωτής έκλουσης με χρήση ανιχνευτή UV.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.2. Οξικό αμμώνιο

3.3. Όξινο θεικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBHS)

3.4. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.5. Μεθανόλη καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.6. N, N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)

3.7. Υδροχλωρικό οξύ, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Πρότυπη ουσία: diclazuril Π-24: (+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5-τετραϋδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζίν-2-υλο) φαινυλ] ακετονιτρίλιο εγγυημένης καθαρότητας, E771.

3.8.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα diclazuril, 500 µg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg πρότυπης ουσίας diclazuril (3.8). Διαλύονται σε DMF (3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^\circ \text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

▼B

3.8.2. Πρότυπο διάλυμα diclazuril, 50 µg/ml

5,00 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.8.1.) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.9. Ουσία εσωτερικού προτύπου: 2,6 διχλωρο-α-(4-χλωροφαινυλο)-4-(4,5 διυδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2(3H)-υλο)α-μεθυλοβενζολο-ακετονιτρίλιο

3.9.1. Αρχικό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 500 µg/ml.

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg ουσίας εσωτερικού προτύπου (3.9). Διαλύονται σε DMF (3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.9.2. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 50 µg/ml.

5,00 ml του αρχικού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.1.) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.9.3. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου για προμείγματα, ρ/1000 mg/ml

(ρ = ονομαστική περιεκτικότητα diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg ρ/10 mg της ουσίας εσωτερικού προτύπου, διαλύονται σε DMF (3.6) σε λουτρό υπερήχων (4.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

3.10. Διάλυμα βαθμονόμησης, 2 µg/ml.

2,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.2) μεταφέρονται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 16 ml DMF (3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν να χρησιμοποιηθεί.

3.11. Στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης C₁₈, π.χ. Bond Elut, μέγεθος: 1 cc, προσροφητικό βάρος: 100 mg.

3.12. Διαλύτης εκχύλισης: οξινισμένη μεθανόλη.

5,0 ml υδροχλωρικού οξέος (3.7) φέρονται με σιφόνιο σε 1 000 ml μεθανόλης (3.5), και αναμειγνύονται.

3.13. Κινητή φάση για HPLC

3.13.1. Υγρό έκλουσης Α: διάλυμα οξικού αμμωνίου-όξινου θειικού τετραβουτυλαμμωνίου.

5 g οξικού αμμωνίου (3.2) και 3,4 g TBHS (3.3) διαλύονται σε 1 000 ml νερού (3.1) και αναμειγνύονται.

3.13.2. Υγρό έκλουσης Β: ακετονιτρίλιο (3.4).

3.13.3. Υγρό έκλουσης Γ: μεθανόλη (3.5).

▼ B**4. Όργανα**

- 4.1. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης
- 4.2. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα τριών διαλυτών βαθμωτής έκλουσης
 - 4.2.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, Hypersil ODS, 3 μm , 100 mm $\times$ 4,6 mm ή ισοδύναμη
 - 4.2.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων
- 4.3. Περιστροφικός εξατμιστήρας υμενίου
- 4.4. Φίλτρο μεμβράνης 0,45 μm
- 4.5. Πολλαπλή κενού (vacuum manifold)
- 4.6. Λουτρό υπερήχων.

5. Διαδικασία**5.1. Γενικά****5.1.1. Τυφλό**

Πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε diclazuril ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό diclazuril ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη μιας ποσότητας diclazuril, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 1 mg/kg, 0,1 ml του αρχικού προτύπου διαλύματος (3.8.1) προστίθενται σε 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2.)

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε 5.1.1), η δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα diclazuril παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση**5.2.1. Ζωοτροφές**

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g περίπου 50 g του δείγματος. Μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθενται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.2) και 200 ml διαλύτη εκχύλισης (3.12) και η φιάλη πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης (4.1) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά. Ποσότητα 20 ml του υπερκείμενου υγρού μεταφέρεται σε κατάλληλο γυάλινο δοχείο και αραιώνεται με 20 ml νερό. Το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε φυσίγγιο εκχύλισης (3.11), και διέρχεται με εφαρμογή κενού (4.5). Η στήλη (3.11) εκπλένεται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχύλισης (3.12) και νερού, 65 + 35 (V + V). Τα συλλεγόμενα κλάσματα απορρίπτονται και οι απομένουσες ουσίες εκλούονται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχύλισης (3.12) και νερού, 80 + 20 (V + V). Το κλάσμα αυτό εξατμίζεται μέχρι ξηρού σχεδόν με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα (4.3) στους 60 °C. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1,0 ml DMF (3.6), προστίθεται 1,5 ml νερό (3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί διήθηση μέσω μεμβράνης (4.4) και κατόπιν ο προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.2.2. Προμείγματα

Ζυγίζεται με ακρίβεια 0,001 g περίπου 1 g του δείγματος. Μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθεται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.9.3), 200 ml διαλύτη εκχύλισης (3.12) και η φιάλη

▼ B

πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης (4.1) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Αφήνεται να κατακαθίσει για 10 λεπτά. Ποσότητα 10 000/p ml (p = ονομαστική περιεκτικότητα του diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg) του υπερκειμένου υγρού μεταφέρεται σε φιάλη στρογγυλού πυθμένα με κατάλληλο μέγεθος. Το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση στους 60 °C με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (4.3). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 10,0 ml DMF (3.6), προστίθενται 15,0 ml νερό (3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.3. *Προσδιορισμός με HPLC*5.3.1. *Παράμετροι*

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 μm ή ισοδύναμη
Κινητή φάση:	Υγρό έκλουσης A υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και όξι- (3.13.1): νου θειικού τετραβου- τυλαμμωνίου
	Υγρό έκλουσης B ακενονιτρίλιο (3.13.2):
	Υγρό έκλουσης C μεθανόλη (3.13.3):
Φάση έκλουσης:	— γραμμική κλίση — αρχικές συνθήκες: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — μετά από 10 λεπτά, κλίση έκλουσης για 30 λεπτά έως: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Πλήρωση με B για 10 λεπτά.
Ρυθμός ροής:	1,5-2 ml/min
Όγκος έγχυσης:	20 μl
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	280 nm

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα βαθμονόμησης (3.10) που περιέχει 2 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. *Διάλυμα βαθμονόμησης*

Εγχύονται κατ' επανάληψη 20 μl του διαλύματος βαθμονόμησης (3.10) και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου.

5.3.3. *Διάλυμα δείγματος*

Εγχύονται κατ' επανάληψη 20 μl του διαλύματος δείγματος (5.2.1 ή 5.2.2) και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**6.1. *Ζωοτροφές*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril w (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 \text{ V}}{m} [\text{mg/kg}]$$

▼B

όπου:

$h_{d,s}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (5.2.1)

$h_{i,s}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (5.2.1)

$h_{d,c}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10)

$h_{i,c}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10)

$c_{d,c}$ = συγκέντρωση του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης σε $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = βάρος του προς δοκιμή δείγματος σε g.

V = όγκος του εκχυλίσματος δείγματος σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.1 (δηλαδή 2,5 ml)

6.2. Προμείγματα

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02 V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

όπου:

$h_{d,c}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10)

$h_{i,c}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης (3.10)

$h_{d,s}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (5.2.2)

$h_{i,s}$ = ύψος (εμβადόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (5.2.2)

$c_{d,c}$ = συγκέντρωση του diclazuril στο διάλυμα βαθμονόμησης σε $\mu\text{g/ml}$ (3.10)

m = βάρος του προς δοκιμή δείγματος σε g.

V = όγκος του εκχυλίσματος δείγματος σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.2 (δηλαδή 25 ml)

p = ονομαστική συγκέντρωση του diclazuril σε mg/kg στο πρόμειγμα

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων

7.1. Ταυτότητα

Η ταυτότητα της αναλύμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (5.2.1 ή 5.2.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (3.10).

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (5.2.1 ή 5.2.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (3.10). Η ποσότητα του προστιθέμενου diclazuril πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του diclazuril που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του diclazuril και της κορυφής του εσωτερικού προτύπου πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 10 \%$ του αρχικού πλάτους της κορυφής του diclazuril ή της κορυφής του εσωτερικού προτύπου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος δείγματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

- Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι ίδια στα πλαίσια των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ισχύ του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη διόδων είναι συνήθως $\pm 2 \text{ nm}$.

▼B

β) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

- το 30 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril από 0,5 mg/kg έως 2,5 mg/kg,
- τα 0,75 mg/kg για περιεκτικότητες σε diclazuril μεταξύ 2,5 mg/kg και 5 mg/kg,
- το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril άνω των 5 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 5 δείγματα από 11 εργαστήρια. Τα δείγματα αυτά συνίσταντο σε δύο προμείγματα το ένα αναμείχθηκε με οργανικό υλικό (O 100) και το άλλο με ανόργανο υλικό (A 100). Η θεωρητική περιεκτικότητα είναι 100 mg diclazuril ανά kg. Οι τρεις μεικτές πτηνοτροφές παρασκευάστηκαν από τρεις διαφορετικούς παραγωγούς (NL) (L1/Z1/K1). Η θεωρητική περιεκτικότητα είναι 1 mg diclazuril ανά kg. Οι οδηγίες προς τα εργαστήρια ήταν να αναλύσουν κάθε δείγμα μια φορά ή εις διπλούν. (Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με αυτή τη διεργαστηριακή μελέτη βλέπε *Journal of AOAC International*, τόμος 77, αριθ. 6, 1994, σ. 1359-1361). Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα.

	Δείγμα 1 A 100	Δείγμα 2 O 100	Δείγμα 3 L1	Δείγμα 4 Z1	Δείγμα 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Μέσος όρος	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Ονομαστική περιεκτικότητα (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

S_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας

▼B

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

9. Παρατηρήσεις

Η απόκριση του diclazuril πρέπει να έχει καταδειχθεί προηγουμένως ότι είναι γραμμική στην περιοχή των μετρούμενων συγκεντρώσεων.

Z. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΤΟΥ LASALOCID ME NATRIO

Άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον Streptomyces lasaliensis

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του άλατος του lasalocid με νάτριο σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 5 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 10 mg/kg.

2. Βασική αρχή της μεθόδου

Το άλας του lasalocid με νάτριο εκχυλίζεται από το δείγμα σε οξυνισμένη μεθανόλη και προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αναστραμμένης φάσης με χρήση φασματοφθορισμομετρικού ανιχνευτή.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4)

3.2. Ορθοφωσφορικό οξύ, w (w/w) = 85 %

3.3. Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος, c = 20 %

Διαλύονται 23,5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.2) σε 100 ml με νερό.

3.4. 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνη (1,5-διμεθυλεξυλαμίνη), w (w/w) = 99 %

3.5. Μεθανόλη καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.6. Υδροχλωρικό οξύ, πυκνότητα = 1,19 g/ml

3.7. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, c = 0,01 mol/l

Διαλύονται 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) σε 500 ml νερού (3.11), προστίθενται 3,5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (3.2) και 10,0 ml 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνης (3.4). Ρυθμίζεται το pH σε 4,0 με διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος (3.3) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 με νερό (3.11).

3.8. Οξυνισμένη μεθανόλη

5,0 ml υδροχλωρικού οξέος (3.6) μεταγγίζονται σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (3.5) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

3.9. Κινητή φάση για την HPLC, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων-διάλυμα μεθανόλης σε αναλογία 5 + 95 (V + V)

Αναμειγνύονται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (3.7) με 95 ml μεθανόλης (3.5).

3.10. Πρότυπη ουσία άλατος lasalocid με νάτριο εγγυημένης καθαρότητας, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg άλατος lasalocid με νάτριο (3.10), διαλύονται σε οξυνισμένη μεθανόλη (3.8), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

▼B

- 3.10.2. Ενδιαμέσσο πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 50 µg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml φέρονται με σιφόνιο 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.10.1) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

- 3.10.3. Διαλύματα αναφοράς

1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 ml του ενδιαμέσου πρότυπου διαλύματος (3.10.2) μεταγγίζονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8) και οι φιάλες ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 µg/ml άλατος lasalocid με νάτριο αντιστοίχως. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

- 3.11. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

4. Εργαστηριακά σκεύη ή όργανα

- 4.1. Λουτρό υπερήχων (ή ανακινούμενο υδατόλουτρο) με ελεγχόμενη θερμοκρασία

- 4.2. Διηθητικές μεμβράνες, 0,45 µm

- 4.3. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης, κατάλληλο για έγχυση όγκων 20 µl.

- 4.3.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 125 mm × 4 mm, υλικό πλήρωσης ανεστραμμένης φάσης C₁₈, 5 µm ή ισοδύναμη

- 4.3.2. Φασματοφθορισμόμετρο με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής

5. Διαδικασία

- 5.1. Γενικά

- 5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2), πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε άλας του lasalocid με νάτριο ούτε κάποια άλλη παρεμποδιστική ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνο του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό άλας του lasalocid με νάτριο ή άλλες παρεμποδιστικές ουσίες.

- 5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας άλατος του lasalocid με νάτριο, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.10.1) μεταγγίζονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επιμελώς και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλ. 5.1.1), η δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα άλατος του lasalocid με νάτριο παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

- 5.2. Εκχύλιση

- 5.2.1. Ζωοτροφές

Σε κωνική φιάλη των 250 ml με πώμα ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,01 g, 5 έως 10 g του δείγματος. Προστίθενται με σιφόνιο 100,0 ml οξυνισμένης

▼B

μεθανόλης (3.8). Τοποθετείται χαλαρά το πώμα και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.1) και αφήνεται για 20 λεπτά στους 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, στη συνέχεια καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (4.2) σε κατάλληλο δοχείο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.2.2. Προμείγματα

Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,001 g, 2 g του μη αλεσμένου προμείγματος. Προστίθενται 100,0 ml οξυνισμένης μεθανόλης (3.8) και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη με το περιεχόμενο της τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.1) και αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περίπου 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8) και αναμειγνύεται επιμελώς. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, στη συνέχεια καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (4.2). Κατάλληλος όγκος του διαηγούς διηθήματος αραιώνεται με οξυνισμένη μεθανόλη (3.8) για να ληφθεί το τελικό διάλυμα της δοκιμής που περιέχει περίπου 4 μg/ml άλατος lasalocid με νάτριο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.3. Προσδιορισμός με HPLC

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες· μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα:

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.3.1):	125 mm × 4 mm, υλικό πλήρωσης ανεστραμμένης φάσης C ₁₈ , 5 μm ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.9):	Μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (3.7) και μεθανόλης (3.5), 5+95 (V+V)
Ρυθμός ροής:	1,2 ml/min
Μήκη κύματος ανίχνευσης:	
Διέγερσης:	310 nm
Εκπομπής:	419 nm
Όγκος έγχυσης:	20 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχέοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα αναφοράς (3.10.3) που περιέχει 4,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Γράφημα βαθμονόμησης

Κάθε διάλυμα αναφοράς (3.10.3) εγχέεται κατ' επανάληψη και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε συγκεντρώση. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων αναφοράς και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχέεται κατ' επανάληψη το εκχύλισμα του δείγματος που προέκυψε στην παράγραφο 5.2.1 ή 5.2.2 χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του άλατος lasalocid με νάτριο.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml προσδιορίζεται από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών τον άλατος lasalocid με νάτριο του διαλύματος του δείγματος βάσει της καμπύλης αναφοράς ή βαθμονόμησης (5.3.3).

▼B6.1. *Ζωοτροφές*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

όπου:

c = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (5.2.1) σε µg/ml

V_1 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.1 σε ml (δηλαδή 100)

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

6.2. *Προμείγματα*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (5.2.2) σε µg/ml

V_2 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.2 σε ml (δηλαδή 250)

f = συντελεστής αραιώσης σύμφωνα με την παράγραφο 5.2.2

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**7.1. *Ταυτότητα*

Οι φασματοφθορισμομετρικές μέθοδοι είναι λιγότερο εκτεθειμένες σε παρεμβολές σε σύγκριση με αυτές που χρησιμοποιούν ανιχνευτή υπεριώδους. Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία.

7.1.1. *Συγχρωματογραφία*

Εκχύλισμα δείγματος (5.2.1 ή 5.2.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος αναφοράς (3.10.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου άλατος lasalocid με νάτριο πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του άλατος lasalocid με νάτριο που βρίσκεται στο εκχύλισμα. Αυξάνεται μόνο το ύψος της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο αφού ληφθεί υπόψη η ποσότητα άλατος lasalocid με νάτριο που προστέθηκε και η αραιώση του εκχυλίσματος. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 10 \%$ του αρχικού πλάτους της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.2. *Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

- το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο από 30 mg/kg έως 100 mg/kg,
- τα 15 mg/kg για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο μεταξύ 100 mg/kg και 200 mg/kg,
- 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο άνω των 200 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Για το εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %. Για τα εμπλουτισμένα δείγματα προμειγμάτων, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

▼B

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή (*) μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 2 προμείγματα (δείγματα 1 και 2) και 5 ζωοτροφές (δείγματα 3 έως 7) από δώδεκα εργαστήρια. Η ανάλυση του κάθε δείγματος έγινε εις διπλούν. Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 Πρόμειγμα για κοτό- πούλα	Δείγμα 2 Πρόμειγμα για γαλοπού- λες	Δείγμα 3 Σύμπληκτα για γαλο- πούλες	Δείγμα 4 Θρύμματα για κοτό- πούλα	Δείγμα 5 Ζωοτροφή για γαλο- πούλες	Δείγμα 6 Ζωοτροφή για που- λερικά Α	Δείγμα 7 Ζωο- τροφή για πουλε- ρικά Β
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Μέσος όρος [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
Ονομαστική περιεκτικό- τητα [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Περιεκτικότητα δηλωμένη από τον κατασκευαστή.

(**) Ζωοτροφή που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

s_r = τυπική απόκλιση ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας

s_R = τυπική απόκλιση διεργαστηριακής επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής διακύμανσης ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότη-
τας, %

CV_R = συντελεστής διακύμανσης διεργαστηριακής επαναληψιμότητας, %.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΓΚΟΣ-ΣΥΠΟΛΗΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της ελεύθερης γκοσσυπόλης, της συνολικής γκοσσυπόλης και των χημικών σχετιζομένων ουσιών εντός σπόρων, αλεύρων και πλακούντων βάμβακος καθώς και εντός σύνθετων τροφών οι οποίες περιέχουν αυτές τις πρώτες ύλες ζωοτροφών. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού της ελεύθερης γκοσσυπόλης, της συνολικής γκοσσυπόλης και των χημικών σχετιζομένων ουσιών είναι 20 mg/kg.

2. Αρχή

Η γκοσσυπόλη εκχυλίζεται παρουσία 3 αμινο 1 προπανόλης, είτε με μείγμα ισοπροπανόλης και εξανίου για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γκοσσυπόλης, είτε με διμεθυλοφορμαμίδη για τον προσδιορισμό της συνολικής γκοσσυπόλης. Η γκοσσυπόλη μετατρέπεται διά της ανιλίνης σε γκοσσυπόλη-διανιλίνη, της οποίας η οπτική πυκνότητα μετρείται στα 440 nm.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου: Αναμειγνύονται 60 μέρη κατ' όγκο ισοπροπανόλης σε 40 μέρη κατ' όγκο κανονικού εξανίου.

3.2. Διαλυτικό μέσον Α: Εντός ογκομετρικής φιάλης του ενός λίτρου τίθενται 500 ml περίπου του μείγματος ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης, 8 ml άνδρου οξικού οξέος και 50 ml νερού. Συμπληρώνεται ο όγκος με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Το αντιδραστήριο αυτό παραμένει σταθερό επί μία εβδομάδα.

3.3. Διαλυτικό μέσο Β: Τίθενται με σιφόνιο εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml, 2 ml 3-αμινο-1-προπανόλης και 10 ml άνδρου οξικού οξέος. Ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συμπληρώνεται ο όγκος με Ν, Ν-διμεθυλοφορμαμίδης. Το εν λόγω αντιδραστήριο παραμένει σταθερό για μία εβδομάδα.

3.4. Ανιλίνη: Αν η οπτική πυκνότητα του τυφλού πειράματος υπερβαίνει την τιμή 0,022, η ανιλίνη αποστάζεται επί κόνεως ψευδαργύρου με απόρριψη των πρώτων και τελευταίων 10 % μερών του αποστάγματος. Εντός πωματισμένης φιάλης και εντός ψυγείου, το αντιδραστήριο αυτό διατηρείται επί πολλούς μήνες.

3.5. Πρότυπο διάλυμα γκοσσυπόλης Α: Τίθενται εντός ογκομετρικής φιάλης των 250 ml, 27,9 mg οξείκης γκοσσυπόλης. Διαλύεται και ο όγκος συμπληρώνεται με το διαλυτικό μέσο Α (3.2). Εισάγονται με σιφόνιο 50 ml του εν λόγω διαλύματος εντός ογκομετρικής φιάλης των 250 ml και συμπληρώνεται ο όγκος με το διαλυτικό μέσο Α. Η συμπύκνωση της γκοσσυπόλης του διαλύματος είναι 0,02 mg/ml. Αφήνεται εν ηρεμία επί μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.

3.6. Πρότυπο διάλυμα γκοσσυπόλης Β: Τίθενται εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml, 27,9 mg οξείκης γκοσσυπόλης. Διαλύεται και συμπληρώνεται ο όγκος με το διαλυτικό μέσο Β (3.3). Η συμπύκνωση της γκοσσυπόλης του εν λόγω διαλύματος είναι 0,5 mg/ml.

Τα πρότυπα διαλύματα γκοσσυπόλης Α και Β παραμένουν σταθερά επί 24 ώρες εφόσον διατηρούνται μακριά από το φως.

4. Όργανα

4.1. Αναμείκτης (παλινδρομητής): 35 περίπου στροφών ανά λεπτό.

▼B

4.2. Φασματοφωτόμετρο

5. **Λιαδικασία**

5.1. Ποσότητα δείγματος

Η ποσότητα δείγματος εξαρτάται από την εκτιμώμενη περιεκτικότητα του δείγματος σε γκοσσυπόλη. Είναι προτιμότερο η εργασία να εκτελείται επί μικρής ποσότητας δείγματος και επί σχετικώς μεγάλου μέρους της ποσότητας του διηθήματος, ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής ποσότητα γκοσσυπόλης για τη διενέργεια επακριβούς φωτομετρικής μέτρησης. Για τον προσδιορισμό της ελεύθερης γκοσσυπόλης εντός των σπόρων βάμβακος, των αλεύρων βάμβακος και των βαμβακοπλακούντων, η ποσότητα του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το ένα γραμμάριο· για σύνθετες τροφές είναι δυνατόν να ανέρχεται έως 5 γραμμάρια. Μέρους της ποσότητας του διηθήματος 10 ml είναι επαρκές για τις περισσότερες περιπτώσεις. Αυτό πρέπει να περιέχει 50 έως 100 μg γκοσσυπόλης. Για τον προσδιορισμό της συνολικής γκοσσυπόλης, η ποσότητα του δείγματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 έως 5 γραμμάρια, ώστε μέρος της ποσότητας του διηθήματος 2 ml να περιέχει 40 έως 200 μg γκοσσυπόλης.

Η ανάλυση πρέπει να διενεργείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20 °C περίπου.

5.2. Προσδιορισμός ελεύθερης γκοσσυπόλης

Η ποσότητα του δείγματος εισάγεται εντός φιάλης χαμηλού περιλαίμιου των 250 ml, της οποίας ο πυθμένας είναι καλυμμένος με υαλόσκονη. Μέσω του σιφωνίου προστίθενται 50 ml διαλυτικού μέσου Α (3.2), πωματίζεται η φιάλη και αναμειγνύονται επί μία ώρα εντός του αναμεικτη. Διηθείται μέσω ξηρού φίλτρου και συλλέγεται το διήθημα εντός μικράς φιάλης χαμηλού περιλαίμιου. Κατά τη διάρκεια της διήθησης το χωνί καλύπτεται με γυαλί ωρολογίου.

Εισάγονται διά του σιφωνίου εντός δύο ογκομετρικών φιαλών των 25 ml (Α και Β) αντιστοίχως όμοια μέρη των ποσοτήτων του διηθήματος τα οποία περιέχουν 50 έως 100 μg γκοσσυπόλης. Συμπληρώνεται ο όγκος, εφόσον χρειάζεται, μέχρι 10 ml με διαλυτικό μέσο Α (3.2). Ακολουθώντας, το περιεχόμενο της φιάλης (Α) συμπληρώνεται με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα αναφοράς για τη μέτρηση του διαλύματος του δείγματος.

Εισάγονται με σιφόνιο 10 ml του διαλυτικού μέσου Α (3.2) εντός των δύο άλλων ογκομετρικών φιαλών 25 ml (Γ και Δ) αντιστοίχως. Συμπληρώνεται ο όγκος του περιεχομένου της φιάλης (Γ) με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα αναφοράς για τη μέτρηση του διαλύματος του τυφλού πειράματος.

Σε κάθε φιάλη (Δ) και (Β) προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4). Θερμαίνονται επί 30 λεπτά επί ζέοντος υδρολούτρου για την ανάπτυξη του χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνονται οι όγκοι με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μία ώρα.

Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του τυφλού πειράματος (Δ) μέσω σύγκρισης με το διάλυμα αναφοράς (Γ) και η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του δείγματος (Β) μέσω σύγκρισης με το διάλυμα αναφοράς (Α) στο φασματοφωτόμετρο σε 440 nm, εντός γυάλινων κυψελίδων 1 cm.

Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος του τυφλού πειράματος αφαιρείται από εκείνη του διαλύματος του δείγματος (= διορθωμένη οπτική πυκνότητα). Από την τιμή αυτή υπολογίζεται η περιεκτικότητα της ελεύθερης γκοσσυπόλης, όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 6.

5.3. Προσδιορισμός της συνολικής γκοσσυπόλης

Εισάγεται ποσότητα δείγματος που περιέχει 1 έως 5 mg γκοσσυπόλης εντός ογκομετρικής φιάλης των 50 ml και προστίθενται 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3). Προετοιμάζεται συγχρόνως ένα τυφλό πείραμα με την εισαγωγή 10 ml διαλυτικού μέσου Β (3.3) εντός άλλης ογκομετρικής φιάλης των 50 ml. Οι δύο φιάλες θερμαίνονται επί 30 λεπτά εντός ζέοντος υδρολούτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και το

▼B

περιεχόμενο κάθε φιάλης συμπληρώνεται μέχρι να γεμίσει με μείγμα ισοπροπανίου-εξανίου (3.1). Ομοιογενοποιείται και αφήνεται εν ηρεμία για χρονικό διάστημα 10 έως 15 λεπτών, ακουλούθως διηθείται και συλλέγεται το διήθημα εντός φιάλης χαμηλού περιλαιμίου.

Τίθενται 2 ml του διηθήματος σε κάθε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και 2 ml του διηθήματος του τυφλού πειράματος εντός δύο άλλων φιαλών των 25 ml. Λαμβάνεται μία φιάλη από κάθε σειρά και τα αντίστοιχα περιεχόμενα συμπληρώνονται μέχρι τα 25 ml με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1). Τα εν λόγω διαλύματα θα χρησιμοποιηθούν ως διαλύματα αναφοράς.

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός δύο άλλων φιαλών. Θερμαίνονται επί 30 λεπτά επί ζέοντος υδρόλουτρου για την ανάπτυξη του χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνονται μέχρι 25 ml με το μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί 1 ώρα.

Προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα, όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 5.2 για την ελεύθερη γκοσσυπόλη. Από την τιμή υπολογίζεται η περιεκτικότητα της συνολικής γκοσσυπόλης, όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 6.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων μπορεί να διενεργηθεί είτε μέσω της ειδικής οπτικής πυκνότητας (6.1), είτε με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης (6.2).

6.1. Με την ειδική οπτική πυκνότητα

Οι τύποι για τον υπολογισμό της ειδικής οπτικής πυκνότητας, βάσει των συνθηκών που περιγράφονται, είναι οι ακόλουθοι:

$$\text{Ελεύθερη γκοσσυπόλη: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Συνολική γκοσσυπόλη: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Η περιεκτικότητα σε ελεύθερη και συνολική γκοσσυπόλη του δείγματος δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{γκοσσυπόλη\%} : \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times p \times a}$$

όπου:

E = διορθωμένη οπτική πυκνότητα, προσδιοριζόμενη σύμφωνα με την παράγραφο 5.2,

p = ποσότητα δείγματος σε γραμμάρια,

a = μέρος ποσότητας του διηθήματος σε ml.

6.2. Με αναφορά στην καμπύλη βαθμονόμησης

6.2.1. Ελεύθερη γκοσσυπόλη

Προετοιμάζονται 2 σειρές από 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 ml. Εισάγονται με σιφόνιο εντός των φιαλών κάθε σειράς όγκοι 2,0-4,0-6,0-8,0 και 10,0 ml του πρότυπου διαλύματος γκοσσυπόλης Α (3.5). Οι όγκοι συμπληρώνονται έως 10 ml με διαλυτικό μέσο Α (3.2). Κάθε σειρά συμπληρώνεται με μάρτυρα ο οποίος αποτελείται από μια ογκομετρική φιάλη των 25 ml που περιέχει μόνο 10 ml διαλυτικού μέσου Α (3.2) (τυφλό πείραμα).

Οι όγκοι των φιαλών της πρώτης σειράς συμπληρώνονται μέχρι τα 25 ml (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα) με το μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) (σειρά αναφοράς).

▼B

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) εντός κάθε φιάλης της δεύτερης σειράς (συμπεριλαμβανομένου του μάρτυρα). Θερμαίνονται επί 30 λεπτά επί ζέοντος υδρόλουτρου για την ανάπτυξη χρωματισμού. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, οι όγκοι συμπληρώνονται με το μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μία ώρα (πρότυπη σειρά).

Με βάση τις συνθήκες που ορίζονται στην παράγραφο 5.2 προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων της πρότυπης σειράς μέσω σύγκρισης με τα αντίστοιχα διαλύματα της σειράς αναφοράς. Η καμπύλη βαθμονόμησης αποτυπώνεται τοποθετώντας τις τιμές των οπτικών πυκνοτήτων έναντι των ποσοτήτων της γκοσσυπόλης (σε μg).

6.2.2. Συνολική γκοσσυπόλη

Προετοιμάζονται έξι (6) ογκομετρικές φιάλες των 50 ml. Εισάγονται εντός της πρώτης φιάλης 10 ml διαλυτικού μέσου B (3.3) και εντός των υπολοίπων 2,0-4,0-6,0-8,0, και 10,0 ml πρότυπου διαλύματος γκοσσυπόλης B (3.6) αντίστοιχως. Το περιεχόμενο της κάθε φιάλης συμπληρώνεται με 10 ml διαλυτικού μέσου B (3.3). Θερμαίνονται επί 30 λεπτά επί ζέοντος υδρόλουτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, οι όγκοι συμπληρώνονται με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) και ομοιογενοποιούνται.

Εισάγονται 2,0 ml των διαλυμάτων αυτών εντός δύο σειρών έξι 6 ογκομετρικών φιαλών των 25 ml αντίστοιχως. Συμπληρώνεται έως 25 ml το περιεχόμενο των φιαλών της πρώτης σειράς με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1) (σειρά αναφοράς).

Προστίθενται 2 ml ανιλίνης (3.4) σε κάθε φιάλη της δεύτερης σειράς. Θερμαίνονται επί 30 λεπτά επί ζέοντος υδρόλουτρου. Ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, οι όγκοι συμπληρώνονται με μείγμα ισοπροπανόλης-εξανίου (3.1), ομοιογενοποιούνται και αφήνονται σε ηρεμία επί μία ώρα (πρότυπη σειρά).

Με βάση τις υποδεικνύμενες συνθήκες στην παράγραφο 5.2 προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα των διαλυμάτων της πρότυπης σειράς μέσω σύγκρισης με τα αντίστοιχα διαλύματα της σειράς αναφοράς. Η καμπύλη βαθμονόμησης αποτυπώνεται τοποθετώντας τις τιμές των οπτικών πυκνοτήτων έναντι των ποσοτήτων της γκοσσυπόλης (σε μg).

6.3. Επαναληψιμότητα

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

- το 15 % σε σχετική τιμή, για τις περιεκτικότητες σε γκοσσυπόλη μικρότερες των 500 ppm,
- τα 75ppm σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεταξύ 500 και 750 ppm,
- το 10 % σε σχετική τιμή, για περιεκτικότητες ανώτερες των 750 ppm.

▼ M6

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΟΞΙΝΩΝ (PCDD/PCDF) ΚΑΙ ΤΩΝ PCB

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I

Μέθοδοι δειγματοληψίας και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων

1. Πεδίο εφαρμογής και ορισμοί

Τα δείγματα που προορίζονται για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των πολυχλωριωμένων διβενζο-π-διοξινών (PCDD), των πολυχλωριωμένων διβενζοφουρανίων (PCDF), των παρόμοιων με διοξίνες πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCB) ⁽¹⁾ και των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB στις ζωτροφές λαμβάνονται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος I. Ισχύουν οι ποσοτικές απαιτήσεις σε σχέση με τον έλεγχο των ουσιών ή προϊόντων που κατανέμονται ομοιόμορφα μέσα στις ζωτροφές, όπως προβλέπεται στο σημείο 5.1 του παραρτήματος I. Τα συνολικά δείγματα που αποκτήθηκαν με τον τρόπο αυτό θεωρούνται αντιπροσωπευτικά των παρτίδων ή υποπαρτίδων από τις οποίες λαμβάνονται. Η συμμόρφωση με τα ανώτατα επίπεδα που προβλέπονται στην οδηγία 2002/32/EK διαπιστώνεται με βάση τα επίπεδα που προσδιορίζονται στα εργαστηριακά δείγματα.

Για τους σκοπούς του παρόντος μέρους B εφαρμόζονται οι ορισμοί του παραρτήματος I της απόφασης 2002/657/EK της Επιτροπής ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Πίνακας TEF (= συντελεστές τοξικής ισοδυναμίας) για PCDD, PCDF και παρόμοια με διοξίνες PCB: οι WHO-TEF για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο βασίζονται στα συμπεράσματα της συνεδρίασης εμπειρογνομόνων του διεθνούς προγράμματος για την ασφάλεια των χημικών ουσιών (IPCS) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), που διεξήχθη στη Γενεύη τον Ιούνιο του 2005 [Martin van den Berg et al., «The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds». *Toxicological Sciences* 93(2), 223-241 (2006)].

Ομοειδής ουσία	Τιμή TEF	Ομοειδής ουσία	Τιμή TEF
Διβενζο-π-διοξίνες («PCDD») και διβενζοφουράνια («PCDF»)		«Παρόμοια με διοξίνες» PCB Μη-ορθο PCB + Mono-ορθο PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Μη-ορθο PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-ορθο-PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν: «T» = τετρα· «Pe» = πεντα· «Hx» = εξα· «Hp» = επτα· «O» = οκτα· «CDD» = χλωροδιβενζοδιοξίνη· «CDF» = χλωροδιβενζοφουράνιο· «CB» = χλωροδιφαινύλιο.

⁽²⁾ Απόφαση 2002/657/EK της Επιτροπής, της 14ης Αυγούστου 2002, για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (ΕΕ L 221 της 17.8.2002, σ. 8).

▼ M6

Επιπλέον των εν λόγω ορισμών, για τους σκοπούς του παρόντος μέρους Β εφαρμόζονται και οι ακόλουθοι ορισμοί:

«Μέθοδοι διαλογής»: μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επιλογή δειγμάτων με επίπεδα PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπερβαίνουν τα ανώτατα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης. Επιτρέπουν επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με καλή σχέση κόστους — αποτελεσματικότητας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες εντοπισμού νέων περιστατικών με υψηλή έκθεση και κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Οι μέθοδοι διαλογής βασίζονται σε βιοαναλυτικές μεθόδους ή μεθόδους GC-MS. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της συμμόρφωσης με το ανώτατο επίπεδο επαληθεύονται με πλήρη νέα ανάλυση από το αρχικό δείγμα με τη χρήση μεθόδου επιβεβαίωσης.

«Μέθοδοι επιβεβαίωσης»: μέθοδοι που παρέχουν πλήρεις ή συμπληρωματικές πληροφορίες οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα σαφούς ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στο ανώτατο επίπεδο ή, σε περίπτωση ανάγκης, στο επίπεδο του ορίου ανάληψης δράσης. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν αεριοχρωματογραφία / φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (GC-HRMS) ή αεριοχρωματογραφία / δίδυμη φασματομετρία μαζών (GC-MS/MS).

2. Συμμόρφωση της παρτίδας ή της υποπαρτίδας με το ανώτατο επίπεδο

2.1. Όσον αφορά τα μη παρόμοια με διοξίνες PCB

Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο αν το αναλυτικό αποτέλεσμα για το άθροισμα των PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 και PCB 180 (εφεξής «μη παρόμοια με τις διοξίνες PCB») δεν υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο που προβλέπεται στην οδηγία 2002/32/EK, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας της μέτρησης⁽¹⁾. Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο που ορίζεται στην οδηγία 2002/32/EK εάν ο μέσος όρος των δύο αναλυτικών αποτελεσμάτων για το ανώτερο όριο⁽²⁾ που θα προκύψουν από την ανάλυση εις διπλούν⁽³⁾, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, δηλαδή η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά την αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης.

Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης υπολογίζεται με τη χρήση ενός συντελεστή κάλυψης ίσου με 2, ο οποίος παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Μια παρτίδα ή υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές αν ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών μείον τη διευρυμένη αβεβαιότητα του μέσου όρου υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο.

⁽¹⁾ Οι αρχές που περιγράφονται στο «Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την αβεβαιότητα μέτρησης για εργαστήρια που διεξάγουν ανάλυση PCDD/F και PCB με φασματομετρία μάζας αραίωσης ισότοπων» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) τηρούνται κατά περίπτωση.

⁽²⁾ Η έννοια του «ανώτερου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τη συμμετοχή κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά. Η έννοια του «κατώτερου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση της μηδενικής τιμής για τη συμμετοχή κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά. Η έννοια του «ενδιάμεσου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση του μισού του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τον υπολογισμό της συμμετοχής κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά.

⁽³⁾ Εις διπλούν ανάλυση: χωριστή ανάλυση των επιθυμητών αναλυτέων ουσιών σε δεύτερη ποσότητα του ίδιου ομογενοποιημένου δείγματος. Κατά κανόνα ισχύουν οι απαιτήσεις για την ανάλυση εις διπλούν που προβλέπονται στο παράρτημα II κεφάλαιο Γ σημείο 3. Ωστόσο, για τις μεθόδους με χρήση εσωτερικού προτύπου με ισοτοπική επισήμανση ¹³C για τις σχετικές προσδιοριζόμενες ουσίες, ανάλυση εις διπλούν είναι απαραίτητη μόνο αν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο. Ανάλυση εις διπλούν χρειάζεται για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή ακούσιας σύγχυσης δειγμάτων. Στην περίπτωση που η ανάλυση εκτελείται στη διάρκεια ενός περιστατικού μόλυνσης, η επιβεβαίωση με ανάλυση εις διπλούν μπορεί να παραλειφθεί αν τα δείγματα που επιλέγονται για ανάλυση μπορούν να συνδεθούν με το περιστατικό μόλυνσης μέσω ιχνηλασιμότητας και το επίπεδο που βρέθηκε υπερβαίνει σημαντικά το ανώτατο επίπεδο.

▼ M6

Οι κανόνες που αναφέρονται στα ανωτέρω εδάφια του παρόντος σημείου εφαρμόζονται για τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προκύπτουν από το δείγμα που λαμβάνεται για επίσημο έλεγχο. Στην περίπτωση αναλύσεων για λόγους προσφυγής ή αναφοράς, εφαρμόζεται η εθνική νομοθεσία.

2.2. Όσον αφορά τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB

Η παρτίδα ή υποπαρτίδα συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο αν το αναλυτικό αποτέλεσμα μεμονωμένης ανάλυσης

- που εκτελείται με μέθοδο διαλογής με ποσοστό ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων χαμηλότερο από 5 % δείχνει ότι το επίπεδο δεν υπερβαίνει το αντίστοιχο ανώτατο επίπεδο των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/EK,
- που εκτελείται με μέθοδο επιβεβαίωσης δεν υπερβαίνει το αντίστοιχο ανώτατο επίπεδο των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/EK, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

Για τις δοκιμασίες διαλογής καθορίζεται μια τιμή αποκοπής (cut-off value) για τη λήψη των αποφάσεων σχετικά με τη συμμόρφωση ή μη του δείγματος με τα αντίστοιχα ανώτατα επίπεδα τα οποία έχουν καθοριστεί είτε για τις PCDD/F είτε για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο που ορίζεται στην οδηγία 2002/32/EK εάν ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο αναλυτικών αποτελεσμάτων για το ανώτερο όριο ⁽¹⁾ που θα προκύψουν από την ανάλυση εις διπλούν ⁽²⁾ με χρήση μιας μεθόδου επιβεβαίωσης, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, δηλαδή η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά την αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης.

Η διευρυμένη αβεβαιότητα της μέτρησης υπολογίζεται με τη χρήση ενός συντελεστή κάλυψης ίσου με 2, ο οποίος παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Μια παρτίδα ή υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές αν ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών μείον τη διευρυμένη αβεβαιότητα του μέσου όρου υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο.

Το άθροισμα της εκτίμησης της διευρυμένης αβεβαιότητας των ξεχωριστών αναλυτικών αποτελεσμάτων των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB χρησιμοποιείται για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

Οι κανόνες που αναφέρονται στα ανωτέρω εδάφια του παρόντος σημείου εφαρμόζονται για τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προκύπτουν από το δείγμα που λαμβάνεται για επίσημο έλεγχο. Στην περίπτωση αναλύσεων για λόγους προσφυγής ή αναφοράς, εφαρμόζεται η εθνική νομοθεσία.

⁽¹⁾ Η έννοια του «ανώτερου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τη συμμετοχή κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο τοξικό ισοδύναμο (TEQ). Η έννοια του «κατώτερου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση της μηδενικής τιμής για τη συμμετοχή κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο TEQ. Η έννοια του «ενδιάμεσου ορίου» απαιτεί τη χρησιμοποίηση του μισού του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τον υπολογισμό της συμμετοχής κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο TEQ.

⁽²⁾ Κατά κανόνα ισχύουν οι απαιτήσεις για την ανάλυση εις διπλούν που προβλέπονται στο παράρτημα II κεφάλαιο 2. Ωστόσο, για τις μεθόδους επιβεβαίωσης με τη χρήση εσωτερικού προτύπου με ισοτοπική επισημάνση ¹³C για τις σχετικές προσδιοριζόμενες ουσίες, ανάλυση εις διπλούν είναι απαραίτητη μόνο αν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο. Ανάλυση εις διπλούν χρειάζεται για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή ακούσιας σύγχυσης δειγμάτων. Στην περίπτωση που η ανάλυση εκτελείται στη διάρκεια ενός περιστατικού μόλυνσης, η επιβεβαίωση με ανάλυση εις διπλούν μπορεί να παραλειφθεί αν τα δείγματα που επιλέγονται για ανάλυση μπορούν να συνδεθούν με το περιστατικό μόλυνσης μέσω ιχνηλασιμότητας και το επίπεδο που βρέθηκε υπερβαίνει σημαντικά το ανώτατο επίπεδο.

▼ M6

3. **Αποτελέσματα που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης σύμφωνα με το παράρτημα II της οδηγίας 2002/32/EK**

Τα όρια ανάληψης δράσης αποτελούν εργαλείο για την επιλογή δειγμάτων στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί μια πηγή μόλυνσης και να ληφθούν μέτρα για τη μείωση ή την εξάλειψή της. Οι μέθοδοι διαλογής καθορίζουν τις κατάλληλες τιμές αποκοπής για την επιλογή αυτών των δειγμάτων. Όταν απαιτούνται σημαντικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό μιας πηγής και τη μείωση ή την εξάλειψη της μόλυνσης, ενδείκνυται να επιβεβαιωθεί η υπέρβαση του ορίου ανάληψης δράσης μέσω ανάλυσης εις διπλούν, με χρήση μιας μεθόδου επιβεβαίωσης και λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης ⁽¹⁾.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Προετοιμασία των δειγμάτων και απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των διοξινών (PCDD/F) και των παρόμοιων με διοξίνες PCB σε ζωοτροφές

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Οι απαιτήσεις που καθορίζονται στο παρόν κεφάλαιο εφαρμόζονται στις αναλύσεις ζωοτροφών για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των υποκατεστημένων στις θέσεις 2,3,7,8 PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και όσον αφορά την προετοιμασία δειγμάτων και τις αναλυτικές απαιτήσεις για άλλους κανονιστικούς σκοπούς, που περιλαμβάνει τους ελέγχους που εκτελούνται από τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για να εξασφαλιστεί η συμμόρφωση με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 183/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ⁽²⁾.

Ο έλεγχος για την παρουσία PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB στις ζωοτροφές μπορεί να διενεργηθεί με δύο διαφορετικούς τύπους αναλυτικών μεθόδων:

α) *Μέθοδοι διαλογής*

Στόχος των μεθόδων διαλογής είναι η επιλογή δειγμάτων με επίπεδα PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπερβαίνουν τα μέγιστα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης. Οι μέθοδοι διαλογής εξασφαλίζουν επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με καλή σχέση κόστους — αποτελεσματικότητας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες εντοπισμού νέων περιστατικών με υψηλή έκθεση και κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Η εφαρμογή τους αποσκοπεί στην αποφυγή αποτελεσμάτων ψευδούς συμμόρφωσης. Μπορούν να περιλαμβάνουν βιοαναλυτικές μεθόδους και μεθόδους GC-MS.

Οι μέθοδοι διαλογής συγκρίνουν το αναλυτικό αποτέλεσμα με μια τιμή αποκοπής, παρέχοντας μια απόφαση τύπου ναι/όχι για την πιθανή υπέρβαση του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης. Η συγκέντρωση των PCDD/F και του αθροίσματος των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν συμμορφώνονται με το ανώτατο επίπεδο προσδιορίζεται ή επιβεβαιώνεται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.

Επιπλέον, οι μέθοδοι διαλογής μπορούν να δώσουν μια ένδειξη των επιπέδων PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που περιέχονται στο δείγμα. Σε περίπτωση εφαρμογής βιοαναλυτικών μεθόδων διαλογής, το αποτέλεσμα εκφράζεται σε βιοαναλυτικά ισοδύναμα (BEQ), ενώ σε περίπτωση εφαρμογής φυσικοχημικών μεθόδων GC-MS εκφράζεται σε τοξικά ισοδύναμα (TEQ). Τα αριθμητικά εκφραζόμενα αποτελέσματα των μεθόδων διαλογής είναι κατάλληλα

⁽¹⁾ Οι εξηγήσεις και οι απαιτήσεις για την εις διπλούν ανάλυση για τον έλεγχο των ορίων ανάληψης δράσης είναι ίδιες με εκείνες της υποσημείωσης 2 ανωτέρω για τα ανώτατα επίπεδα.

⁽²⁾ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 183/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 12ης Ιανουαρίου 2005, περί καθορισμού των απαιτήσεων για την υγιεινή των ζωοτροφών (ΕΕ L 35 της 8.2.2005, σ. 1).

▼ M6

για να καταδείξουν τη συμμόρφωση ή την υπόνοια μη συμμόρφωσης ή υπέρβασης των ορίων ανάληψης δράσης και να παράσχουν μια ένδειξη για το εύρος των επιπέδων σε περίπτωση επανέλεγχου με μεθόδους επιβεβαίωσης. Δεν είναι κατάλληλα για σκοπούς όπως η εκτίμηση των επιπέδων υποβάθρου, η εκτίμηση της πρόσληψης, η παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης των επιπέδων ή η εκ νέου αξιολόγηση των ορίων ανάληψης δράσης και των ανώτατων επιπέδων.

β) Μέθοδοι επιβεβαίωσης

Οι μέθοδοι επιβεβαίωσης επιτρέπουν την αναμφισβήτητη ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπάρχουν σε ένα δείγμα και παρέχουν πλήρη στοιχεία σε επίπεδο ομοειδών ουσιών. Ως εκ τούτου, οι εν λόγω μέθοδοι επιτρέπουν τον έλεγχο των ανώτατων επιπέδων και των ορίων ανάληψης δράσης, καθώς και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από μεθόδους διαλογής. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των χαμηλών επιπέδων υποβάθρου κατά τον έλεγχο των ζωοτροφών, την παρακολούθηση των χρονικών τάσεων, την αξιολόγηση της έκθεσης και τη δημιουργία βάσης δεδομένων για πιθανή επαναξιολόγηση των ορίων ανάληψης δράσης και των ανώτατων επιπέδων. Αυτές οι μέθοδοι είναι επίσης σημαντικές για τον καθορισμό του προφίλ ομοειδών ουσιών με σκοπό τον εντοπισμό της πηγής μιας πιθανής μόλυνσης. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν GC-HRMS. Για την επιβεβαίωση της συμμόρφωσης ή της μη συμμόρφωσης με το ανώτατο επίπεδο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και GC-MS/MS.

2. Ιστορικό

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων TEQ, οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ουσιών σε ένα δεδομένο δείγμα πολλαπλασιάζονται επί τον αντίστοιχο συντελεστή τοξικής ισοδυναμίας τους (TEF) (βλέπε υποσημείωση 1 του κεφαλαίου I) και στη συνέχεια αθροίζονται για να προκύψει η συνολική συγκέντρωση των παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων, εκφρασμένη σε τοξικά ισοδύναμα (TEQ).

Για τους σκοπούς του παρόντος μέρους B, το αποδεκτό ειδικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού μιας επιμέρους ομοειδούς ουσίας είναι η χαμηλότερη περιεκτικότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα και η οποία πληροί τα κριτήρια ταυτοποίησης που περιγράφονται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους του Οργανισμού Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού μιας επιμέρους ομοειδούς ουσίας είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ως:

- α) η συγκέντρωση μιας προσδιοριζόμενης ουσίας στο εκχύλισμα δείγματος η οποία παράγει απόκριση των οργάνων σε δύο διαφορετικά ιόντα που πρόκειται να ελεγχθούν με λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) 3:1 για το λιγότερο εντατικό σήμα ανεπεξέργαστων δεδομένων ή
- β) αν, για τεχνικούς λόγους, ο υπολογισμός του λόγου σήματος προς θόρυβο δεν παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα, το κατώτατο σημείο συγκέντρωσης σε μια καμπύλη βαθμονόμησης που παρέχει μια αποδεκτή (≤ 30 %) και συνεπή (μετρημένη τουλάχιστον στην αρχή και στο τέλος μιας αναλυτικής σειράς δειγμάτων) απόκλιση από τον μέσο σχετικό συντελεστή απόκρισης, υπολογισμένη για όλα τα σημεία στην καμπύλη βαθμονόμησης σε κάθε σειρά δειγμάτων. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) υπολογίζεται από το κατώτατο σημείο συγκέντρωσης, λαμβάνοντας υπόψη την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων και τη φόρτωση δείγματος.

▼ M6

Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι διαλογής δεν δίνουν αποτελέσματα στο επίπεδο των ομοειδών ουσιών, αλλά παρέχουν απλώς μια ένδειξη⁽¹⁾ του επιπέδου TEQ, εκφρασμένου σε BEQ, ώστε να λαμβάνεται υπόψη ότι είναι πιθανό κάποιες από τις ενώσεις που περιέχονται σε εκχύλισμα δείγματος και προκαλούν απόκριση στη δοκιμή να μην ικανοποιούν όλες τις απαιτήσεις της αρχής TEQ.

Οι μέθοδοι διαλογής και οι μέθοδοι επιβεβαίωσης μπορεί να εφαρμόζονται μόνο για τον έλεγχο συγκεκριμένης μήτρας αν είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να ανιχνεύουν με αξιόπιστο τρόπο συγκεντρώσεις στο όριο ανάληψης δράσης ή στο ανώτατο επίπεδο.

3. Απαιτήσεις διασφάλισης ποιότητας

- 3.1. Πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για την αποφυγή της διασταυρούμενης μόλυνσης σε κάθε στάδιο της διαδικασίας δειγματοληψίας και ανάλυσης.
- 3.2. Τα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται και να μεταφέρονται σε κατάλληλους για τον σκοπό αυτόν περιέκτες από γυαλί, αλουμίνιο, πολυπροπυλένιο ή πολυαιθυλένιο, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε PCDD/F και σε παρόμοια με διοξίνες PCB. Πρέπει να αφαιρούνται τα ίχνη σκόνης χαρτιού από τον περιέκτη του δείγματος.
- 3.3. Η αποθήκευση και η μεταφορά των δειγμάτων πρέπει να διεξάγονται κατά τρόπο ώστε να διατηρείται η ακεραιότητα του δείγματος ζωοτροφής.
- 3.4. Εφόσον ενδείκνυται, κάθε εργαστηριακό δείγμα κονιοποιείται και αναμιγνύεται πλήρως με διαδικασία που αποδεδειγμένα επιτυγχάνει πλήρη ομογενοποίηση (π.χ. το κονιοποιημένο δείγμα να διέρχεται από κόσκινο 1 mm)· τα δείγματα ξηραίνονται πριν από την κονιοποίηση αν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι πολύ υψηλή.
- 3.5. Πρέπει να διενεργείται έλεγχος των αντιδραστηρίων, των γυάλινων σκευών και του εξοπλισμού για το ενδεχόμενο να επηρεάζουν τα αποτελέσματα που βασίζονται στα TEQ ή τα BEQ.
- 3.6. Πρέπει να εκτελείται ανάλυση τυφλού δείγματος με τη διεξαγωγή ολόκληρης της αναλυτικής διαδικασίας, από την οποία παραλείπεται μόνο το δείγμα.
- 3.7. Για τις βιοαναλυτικές μεθόδους, πρέπει να εξακριβώνεται αν όλα τα γυάλινα σκεύη και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση είναι απαλλαγμένα από ενώσεις που παρεμποδίζουν την ανίχνευση των στοχευόμενων ενώσεων στο πεδίο τιμών εργασίας. Τα γυάλινα σκεύη εκπλένονται με διαλύτες ή θερμαίνονται σε θερμοκρασίες κατάλληλες για την απομάκρυνση από την επιφάνειά τους των ιχνών PCDD/F, παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων και παρεμποδιστικών ενώσεων.
- 3.8. Η ποσότητα των δειγμάτων που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πρέπει να είναι αρκετή ώστε να πληρούνται οι απαιτήσεις όσον αφορά ένα επαρκώς χαμηλό πεδίο τιμών εργασίας, συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων μέγιστων επιπέδων ή ορίων ανάληψης δράσης.
- 3.9. Κατά τις ειδικές διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τα υπό εξέταση προϊόντα τηρούνται οι διεθνώς αποδεκτές κατευθυντήριες γραμμές.

⁽¹⁾ Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι δεν είναι ειδικές για εκείνες τις ομοειδείς ουσίες που περιλαμβάνονται στο σύστημα των TEF (συντελεστών τοξικής ισοδυναμίας). Άλλες ανάλογης δομής ενώσεις με δράση στους AhR (υποδοχείς αρυλικών υδρογονανθράκων) μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα και να συμβάλλουν στη συνολική απόκριση. Επομένως, τα βιοαναλυτικά αποτελέσματα δεν μπορούν να αποτελούν εκτίμηση, αλλά μάλλον ένδειξη του επιπέδου TEQ στο δείγμα.

▼ M6

4. Απαιτήσεις για τα εργαστήρια

- 4.1. Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 882/2004, η διαπίστευση των εργαστηρίων γίνεται από αναγνωρισμένο οργανισμό που λειτουργεί σύμφωνα με τον οδηγό ISO 58, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα εργαστήρια εφαρμόζουν μεθόδους διασφάλισης της ποιότητας. Η διαπίστευση των εργαστηρίων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025. Οι αρχές που περιγράφονται στις «Τεχνικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και τα όρια ποσοτικοποίησης για ανάλυση PCDD/F και PCB» τηρούνται κατά περίπτωση ⁽¹⁾.
- 4.2. Η επάρκεια των εργαστηρίων πρέπει να αποδεικνύεται με συνεχή επιτυχή συμμετοχή σε διεργαστηριακές μελέτες για τον προσδιορισμό των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB σε σχετικές μήτρες δείγματος ζωοτροφών και περιοχές συγκέντρωσης.
- 4.3. Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν μεθόδους διαλογής για έλεγχο δειγμάτων ρουτίνας συνεργάζονται στενά με τα εργαστήρια που εφαρμόζουν τη μέθοδο επιβεβαίωσης, τόσο για τον έλεγχο ποιότητας όσο και για την επιβεβαίωση του αναλυτικού αποτελέσματος των ύποπτων δειγμάτων.

5. Βασικές απαιτήσεις που πρέπει να τηρεί μια αναλυτική διαδικασία για τις διοξίνες (PCDD/F) και τα παρόμοια με διοξίνες PCB

5.1. Χαμηλό εύρος εργασίας και όρια ποσοτικού προσδιορισμού

Όσον αφορά τις PCDD/F, οι ανιχνεύσιμες ποσότητες πρέπει να είναι στην ανώτερη κλίμακα των φεμτογραμμάτων (10^{-15} g) εξαιτίας της εξαιρετικής τοξικότητας ορισμένων από τις ενώσεις αυτές. Για τα περισσότερα ομοειδή PCB, ένα όριο ποσοτικού προσδιορισμού στο φάσμα των νανογραμμάτων (10^{-9} g) είναι επαρκές. Για τη μέτρηση των πιο τοξικών παρόμοιων με διοξίνες ομοειδών PCB (ιδίως των μη ορθο-υποκατεστημένων ομοειδών ουσιών), το κατώτατο άκρο του πεδίου τιμών εργασίας πρέπει να φθάνει στη χαμηλότερη περιοχή της κλίμακας των πικογραμμάτων (10^{-12} g). Για όλα τα υπόλοιπα ομοειδή PCB, ένα όριο ποσοτικού προσδιορισμού στην κλίμακα των νανογραμμάτων (10^{-9} g) είναι επαρκές.

5.2. Υψηλή εκλεκτικότητα (ειδικότητα)

- 5.2.1. Οι PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB πρέπει να διακρίνονται από πολλές άλλες ενώσεις που συνεκχυλίζονται και πιθανώς προκαλούν παρεμβολές, και οι οποίες είναι παρούσες σε συγκεντρώσεις έως και πολλές τάξεις μεγέθους υψηλότερες από εκείνες των υπό μελέτη προσδιοριζόμενων ουσιών. Για τις μεθόδους GC-MS είναι αναγκαία η διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων ομοειδών ουσιών, όπως μεταξύ των τοξικών (π.χ. τα δεκαεπτά υποκατεστημένα στις θέσεις 2,3,7,8 PCDD/F και τα δώδεκα παρόμοια με διοξίνες PCB) και των άλλων ομοειδών ουσιών.

- 5.2.2. Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν τις ενώσεις-στόχους ως το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB. Ο καθαρισμός των δειγμάτων αποσκοπεί στην αφαίρεση των ενώσεων που προκαλούν ψευδώς μη συμμορφούμενα αποτελέσματα ή των ενώσεων που μπορούν να μειώσουν την απόκριση, προκαλώντας ψευδώς συμμορφούμενα αποτελέσματα.

5.3. Υψηλή ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα, φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας)

- 5.3.1. Για τις μεθόδους GC-MS ο προσδιορισμός παρέχει έγκυρη εκτίμηση της αληθούς συγκέντρωσης σε ένα δείγμα. Η υψηλή ακρίβεια είναι αναγκαία για να αποφευχθεί η απόρριψη του αποτελέσματος της ανάλυσης του δείγματος λόγω χαμηλής αξιοπιστίας του προσδιορισμού του TEQ.

⁽¹⁾ «Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την αβεβαιότητα μέτρησης για εργαστήρια που διεξάγουν ανάλυση PCDD/F και PCB με φασματομετρία μάζας αραίωσης ισοτόπων» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), «Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την εκτίμηση LOD και LOQ για μετρήσεις στον τομέα των ζωοτροφών και των τροφίμων» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

▼ M6

Η ακρίβεια εκφράζεται ως *ορθότητα* (διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής που μετρήθηκε για μια προσδιοριζόμενη ουσία σε ένα πιστοποιημένο υλικό και της πιστοποιημένης τιμής του, που εκφράζεται ως ποσοστό της τιμής αυτής) και ως *πιστότητα* (RSD_R , σχετική τυπική απόκλιση που υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας).

5.3.2. Για τις βιοαναλυτικές μεθόδους προσδιορίζεται η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας. Ως φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας νοείται το επίπεδο BEQ που υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης TCDD ή PCB 126 με διόρθωση για τυφλό και κατόπιν διαίρεση διά της τιμής TEQ που καθορίζεται με τη μέθοδο επιβεβαίωσης. Αποσκοπεί στη διόρθωση παραγόντων, όπως η απώλεια PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων κατά τα στάδια της εκχύλισης και του καθαρισμού, οι συνεκχυλιζόμενες ενώσεις που αυξάνουν ή μειώνουν την απόκριση (αγωνιστική και ανταγωνιστική δράση), η ποιότητα της προσαρμογής της καμπύλης ή οι διαφορές μεταξύ των τιμών TEF και σχετικής ισχύος (REP). Η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας υπολογίζεται από κατάλληλα δείγματα αναφοράς με αντιπροσωπευτικό προφίλ ομοειδών ουσιών κοντά στο επίπεδο που ενδιαφέρει.

5.4. *Επικύρωση στο εύρος του ανώτατου επιπέδου και γενικά μέτρα ελέγχου ποιότητας*

5.4.1. Τα εργαστήρια αποδεικνύουν την επίδοση μιας μεθόδου στην κλίμακα του ανώτατου επιπέδου, π.χ. 0,5, 1 και 2 φορές το ανώτατο επίπεδο, συμπεριλαμβανομένου ενός αποδεκτού συντελεστή μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες αναλύσεις, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επικύρωσης και της ανάλυσης ρουτίνας.

5.4.2. Τακτικές τυφλές δοκιμές και πειράματα εμβολιασμού των δειγμάτων ή ανάλυση δειγμάτων ελέγχου (κατά προτίμηση, εφόσον είναι διαθέσιμο, πιστοποιημένου υλικού αναφοράς) πρέπει να εκτελούνται ως μέτρα εσωτερικής διασφάλισης της ποιότητας. Διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου για τους τυφλούς ελέγχους, τα πειράματα εμβολιασμού και τις αναλύσεις δειγμάτων-μαρτύρων καταγράφονται και ελέγχονται ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι αναλυτικές επιδόσεις πληρούν τις απαιτήσεις.

5.5. *Όριο ποσοτικού προσδιορισμού*

5.5.1. Για μια βιοαναλυτική μέθοδο διαλογής ο καθορισμός του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση, αλλά πρέπει να αποδεικνύεται ότι η μέθοδος μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ της τιμής του τυφλού και της τιμής αποκοπής. Κατά την αναφορά του επιπέδου BEQ καθορίζεται ένα επίπεδο αναφοράς για τη διεκπεραίωση των δειγμάτων που εμφανίζουν απόκριση χαμηλότερη από αυτό το επίπεδο. Το επίπεδο αναφοράς πρέπει αποδεδειγμένα να είναι τουλάχιστον τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας, με απόκριση χαμηλότερη από το εύρος εργασίας. Επομένως, πρέπει να υπολογίζεται με βάση δείγματα που περιέχουν περίπου το απαιτούμενο ελάχιστο επίπεδο των στοχευόμενων ενώσεων και όχι με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο ή το τυφλό δοκιμασίας.

5.5.2. Το LOQ για μια μέθοδο επιβεβαίωσης αντιστοιχεί περίπου στο ένα πέμπτο του ανώτατου επιπέδου.

5.6. *Κριτήρια ανάλυσης*

Για αξιόπιστα αποτελέσματα από μεθόδους επιβεβαίωσης ή μεθόδους διαλογής πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου για την τιμή TEQ ή BEQ, αντίστοιχα, είτε αυτή προσδιορίζεται ως συνολικό TEQ ή ως συνολικό BEQ (ως το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB) είτε χωριστά για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB:

▼ M6

	Διαλογή με βιοαναλυτικές ή φυσικοχημικές μεθόδους	Μέθοδοι επιβεβαίωσης
Ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων ⁽¹⁾	< 5 %	
Ορθότητα		– 20 % έως + 20 %
Επαναληψιμότητα (RSD _r)	< 20 %	
Ενδιάμεση πιστότητα (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ Όσον αφορά τα ανώτατα επίπεδα.

5.7. Ειδικές απαιτήσεις για μεθόδους διαλογής

5.7.1. Για τη διαλογή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο οι μέθοδοι GC-MS όσο και βιοαναλυτικές μέθοδοι. Για τις μεθόδους GC-MS πρέπει να πληρούνται οι απαιτήσεις του σημείου 6. Για τις κυτταρικές βιοαναλυτικές μεθόδους καθορίζονται ειδικές απαιτήσεις στο σημείο 7.

5.7.2. Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν μεθόδους διαλογής για τον έλεγχο δειγμάτων ρουτίνας συνεργάζονται στενά με τα εργαστήρια που εφαρμόζουν τη μέθοδο επιβεβαίωσης.

5.7.3. Απαιτείται επαλήθευση της επίδοσης της μεθόδου διαλογής κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ρουτίνας, μέσω αναλυτικού ποιοτικού ελέγχου και διαρκούς επικύρωσης μεθόδου. Πρέπει να υπάρχει πρόγραμμα συνεχούς ελέγχου των συμμορφούμενων αποτελεσμάτων.

5.7.4. Έλεγχος για πιθανή καταστολή της κυτταρικής απόκρισης και της κυτταροτοξικότητας:

Το 20 % των εκχυλισμάτων δειγμάτων υποβάλλονται σε μέτρηση με διαλογή ρουτίνας χωρίς και με την προσθήκη 2,3,7,8-TCDD σε ποσοτήτα που αντιστοιχεί στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης, για να ελεγχθεί αν η απόκριση εξαλείφεται ενδεχομένως από παρεμποδιστές που βρίσκονται στο εκχύλισμα δείγματος. Η μετρούμενη συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος συγκρίνεται με το άθροισμα της συγκέντρωσης του μη εμβολιασμένου εκχυλίσματος και της συγκέντρωσης εμβολιασμού. Αν αυτή η μετρούμενη συγκέντρωση είναι χαμηλότερη από την υπολογισθείσα συγκέντρωση (άθροισμα) κατά ποσοστό άνω του 25 %, αυτό αποτελεί ένδειξη πιθανής καταστολής του σήματος, και το αντίστοιχο δείγμα πρέπει να υποβληθεί σε ανάλυση επιβεβαίωσης με GC-HRMS. Τα αποτελέσματα παρακολουθούνται σε διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου.

5.7.5. Ποιοτικός έλεγχος σε συμμορφούμενα δείγματα:

Περίπου το 2 % έως 10 % των συμμορφούμενων δειγμάτων, ανάλογα με τη μήτρα δείγματος και την εργαστηριακή πείρα, επιβεβαιώνονται με τη μέθοδο GC/HRMS.

5.7.6. Προσδιορισμός των ποσοστών ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων με βάση τα στοιχεία του ποιοτικού ελέγχου:

Προσδιορίζεται το ποσοστό των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων από τη διαλογή των δειγμάτων κάτω και πάνω από το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης. Τα πραγματικά ποσοστά ψευδώς συμμορφούμενων πρέπει να είναι κάτω από 5 %. Όταν από τον ποιοτικό έλεγχο σε συμμορφούμενα δείγματα προκύπτουν τουλάχιστον 20 επιβεβαιωμένα αποτελέσματα ανά μήτρα / ομάδα μητρών δείγματος, τα

▼ M6

συμπεράσματα για το ποσοστό των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων εξάγονται από αυτά τα στοιχεία. Στον ελάχιστο αριθμό των 20 αποτελεσμάτων για την αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδοσυμμορφούμενων μπορούν να περιλαμβάνονται επίσης τα αποτελέσματα από δείγματα που έχουν αναλυθεί σε διεργαστηριακές δοκιμές ή κατά τη διάρκεια περιστατικών μόλυνσης και τα οποία καλύπτουν εύρος συγκεντρώσεων έως και, π.χ., το διπλάσιο του ανώτατου επιπέδου (ME). Τα δείγματα πρέπει να καλύπτουν τα συχνότερα προφίλ ομοειδών ουσιών και να αντιπροσωπεύουν διάφορες πηγές.

Παρ' ότι οι δοκιμασίες διαλογής αποσκοπούν κατά προτίμηση στην ανίχνευση δειγμάτων που υπερβαίνουν το όριο ανάληψης δράσης, το κριτήριο προσδιορισμού των ποσοστών των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης της μεθόδου επιβεβαίωσης.

- 5.7.7. Τα δυνητικώς μη συμμορφούμενα δείγματα από τη διαλογή επαληθεύονται πάντα με πλήρη εκ νέου ανάλυση του αρχικού δείγματος με μια μέθοδο επιβεβαίωσης. Τα εν λόγω δείγματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων. Για τις μεθόδους διαλογής το ποσοστό των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων αντιστοιχεί στο ποσοστό των αποτελεσμάτων των οποίων η συμμόρφωση επιβεβαιώνεται μέσω της ανάλυσης επιβεβαίωσης, ενώ τα αντίστοιχα δείγματα είχαν βρεθεί ενδεχομένως μη συμμορφούμενα κατά την προηγούμενη ανάλυση διαλογής. Η αξιολόγηση των πλεονεκτημάτων της μεθόδου διαλογής βασίζεται στη σύγκριση των ψευδώς μη συμμορφούμενων δειγμάτων με τον συνολικό αριθμό των ελεγχθέντων δειγμάτων. Αυτό το ποσοστό πρέπει να είναι τόσο χαμηλό ώστε η χρήση της μεθόδου διαλογής να είναι πλεονεκτική.

- 5.7.8. Υπό συνθήκες επικύρωσης, οι βιοαναλυτικές μέθοδοι πρέπει να παρέχουν έγκυρη ένδειξη του επιπέδου TEQ, υπολογισμένου και εκφρασμένου σε BEQ.

Επίσης, για τις βιοαναλυτικές μεθόδους που εκτελούνται σε επαναλαμβανόμενες συνθήκες η ενδοεργαστηριακή RSD_r είναι κατά κανόνα μικρότερη υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSD_R).

6. Ειδικές απαιτήσεις για μεθόδους GC-MS που πρέπει να τηρούνται για σκοπούς διαλογής ή επιβεβαίωσης

- 6.1. *Αποδεκτές διαφορές μεταξύ αποτελεσμάτων WHO-TEQ ανώτερου ορίου και κατώτερου ορίου*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων ανώτερου ορίου και κατώτερου ορίου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % για την επαλήθευση της υπέρβασης του ανώτατου επιπέδου ή, σε περίπτωση ανάγκης, των ορίων ανάληψης δράσης.

- 6.2. *Έλεγχος ανακρίσεων*

- 6.2.1. Η προσθήκη εσωτερικών προτύπων PCDD/F υποκατεστημένων στις θέσεις 2, 3, 7, 8 με ισοτοπική επισήμανση ¹³C και των εσωτερικών προτύπων παρόμοιων με τις διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση ¹³C πραγματοποιείται πολύ νωρίς, στην αρχή της μεθόδου ανάλυσης, δηλαδή πριν από την εκχύλιση, για να επικυρωθεί η αναλυτική διαδικασία. Προστίθεται τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για καθεμία από τις ομόλογες ομάδες των τετρα- έως οκτα-χλωριωμένων ομόλογων ομάδων PCDD/F και τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για καθεμία από τις ομόλογες ομάδες των παρόμοιων με διοξίνες PCB (εναλλακτικά, τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για κάθε φασματομετρικά επιλεγμένη λειτουργία καταγραφής ιόντων που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB). Στην περίπτωση των μεθόδων επιβεβαίωσης, χρησιμοποιούνται και τα 17 εσωτερικά πρότυπα PCDD/F υποκατεστημένα στις θέσεις 2,3,7,8 με ισοτοπική επισήμανση ¹³C και τα 12 εσωτερικά πρότυπα παρόμοιων με τις διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση ¹³C.

▼ **M6**

- 6.2.2. Πρέπει επίσης να προσδιοριστούν οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης για εκείνες τις ομοειδείς ουσίες για τις οποίες δεν προστίθεται κανένα ανάλογο με ισοτοπική επισημάνση ^{13}C , με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων διαλυμάτων βαθμονόμησης.
- 6.2.3. Για τις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης και τις ζωοτροφές ζωικής προέλευσης που περιέχουν λιγότερο από 10 % λίπος, είναι υποχρεωτική η προσθήκη των εσωτερικών προτύπων πριν από την εκχύλιση. Για τις ζωοτροφές ζωικής προέλευσης που περιέχουν περισσότερο από 10 % λίπος, τα εσωτερικά πρότυπα μπορούν να προστίθενται είτε πριν είτε μετά την εκχύλιση του λίπους. Πραγματοποιείται κατάλληλη επικύρωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο εισάγονται εσωτερικά πρότυπα.
- 6.2.4. Πριν από την ανάλυση GC-MS πρέπει να προστίθενται 1 ή 2 πρότυπα ανάκτησης (υποκατάστατα).
- 6.2.5. Απαιτείται έλεγχος της ανάκτησης. Για τις μεθόδους επιβεβαίωσης τα ποσοστά ανάκτησης των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να κυμαίνονται από 60 % έως 120 %. Χαμηλότερα ή υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για επιμέρους ομοειδείς ουσίες, ιδίως ορισμένες επτα- και οκτα-χλωριωμένες διβενζοδιοξίνες και διβενζοφουράνια, είναι αποδεκτά, υπό τον όρο ότι η συμμετοχή τους στην τιμή TEQ δεν υπερβαίνει το 10 % της συνολικής τιμής TEQ (με βάση το άθροισμα των PCDD/PCDF και των παρόμοιων με διοξίνες PCB). Για τις μεθόδους διαλογής GC-MS τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονται από 30 % έως 140 %.
- 6.3. *Αφαίρεση παρεμποδιστών*
- Πραγματοποιείται διαχωρισμός των PCDD/F από τις παρεμποδίζουσες χλωριωμένες ενώσεις, όπως τα μη παρόμοια με διοξίνες PCB και τους χλωριωμένους διφαινυλικούς αιθέρες, μέσω κατάλληλων χρωματογραφικών τεχνικών (κατά προτίμηση με στήλη florisil, αλουμίνας και/ή άνθρακα).
 - Κατά τον διαχωρισμό των ισομερών με αεριοχρωματογραφία η απόσταση μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν στα 1,2,3,4,7,8-HxCDF και 1,2,3,6,7,8-HxCDF πρέπει να είναι < 25 %.
- 6.4. *Βαθμονόμηση με πρότυπη καμπύλη*
- Το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης πρέπει να καλύπτει το σχετικό εύρος του ανώτατου επιπέδου ή των ορίων ανάλυσης δράσης.
- 6.5. *Ειδικά κριτήρια για τις μεθόδους επιβεβαίωσης*
- Για την GC-HRMS:

Στη μέθοδο HRMS η διακριτική ικανότητα πρέπει τυπικά να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 10 000 για ολόκληρο το πεδίο τιμών μάζας στο 10 % του ύψους των κορυφών.

Εκ πλήρους περαιτέρω κριτηρίων ταυτοποίησης και επιβεβαίωσης, όπως περιγράφεται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους EPA 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν.
 - Για την GC-MS/MS:

Έλεγχος τουλάχιστον 2 ειδικών μητρικών ιόντων, καθενός με ένα συγκεκριμένο αντίστοιχο θυγατρικό ιόν μετάβασης για όλες τις επισημασμένες και μη επισημασμένες προσδιοριζόμενες ουσίες στο πεδίο εφαρμογής της ανάλυσης.

Μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή ανοχής των σχετικών εντάσεων ιόντων $\pm 15\%$ για επιλεγμένα θυγατρικά ιόντα μετάβασης σε σύγκριση με υπολογισμένες ή μετρημένες τιμές (μέσος όρος από πρότυπα βαθμονόμησης), με την εφαρμογή ίδιων συνθηκών MS/MS, ιδίως την ενέργεια σύγκρουσης και την πίεση αερίου σύγκρουσης, για κάθε μετάβαση μιας προσδιοριζόμενης ουσίας.

▼ **M6**

Η διακριτική ικανότητα για κάθε τετράπολο θα οριστεί ως ίση ή ανώτερη της διακριτικής ικανότητας μοναδιαίας μάζας (διακριτική ικανότητα μοναδιαίας μάζας: επαρκής διακριτική ικανότητα για τον διαχωρισμό δύο κορυφών που διαφέρουν κατά μία μονάδα μάζας), για την ελαχιστοποίηση πιθανών παρεμβολών στις προσδιοριζόμενες ουσίες που ενδιαφέρουν.

Εκ πλήρωσης περαιτέρω κριτηρίων όπως περιγράφονται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους EPA 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν, με εξαίρεση την υποχρέωση χρήσης GC-HRMS.

7. Ειδικές απαιτήσεις για τις βιοαναλυτικές μεθόδους

Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι είναι μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση βιολογικών αρχών όπως οι δοκιμασίες με βάση κύτταρα, οι δοκιμασίες με υποδοχείς ή οι ανοσοαναλυτικές δοκιμασίες. Το παρόν σημείο 7 καθορίζει απαιτήσεις για βιοαναλυτικές μεθόδους γενικά.

Κατ' αρχήν μια μέθοδος διαλογής ταξινομεί ένα δείγμα ως συμμορφούμενο ή πιθανώς μη συμμορφούμενο. Για τον σκοπό αυτό, το υπολογιζόμενο επίπεδο BEQ συγκρίνεται με την τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.3). Τα δείγματα κάτω από την τιμή αποκοπής δηλώνονται ως συμμορφούμενα· για τα δείγματα που βρίσκονται στην τιμή αποκοπής ή πάνω από αυτήν υπάρχει υπόνοια ότι δεν συμμορφώνονται και απαιτείται ανάλυση με μέθοδο επιβεβαίωσης. Στην πράξη, ένα επίπεδο BEQ που αντιστοιχεί στα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η πιο κατάλληλη τιμή αποκοπής που εξασφαλίζει ένα ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων κάτω από 5 % και ένα αποδεκτό ποσοστό για ψευδώς μη συμμορφούμενα αποτελέσματα. Με χωριστά μέγιστα επίπεδα για PCDD/F και για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, ο έλεγχος της συμμόρφωσης των δειγμάτων χωρίς κλασμάτωση απαιτεί κατάλληλες τιμές αποκοπής για τη βιολογική δοκιμασία για τις PCDD/F. Για τον έλεγχο των δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης ως τιμή αποκοπής λαμβάνεται ένα κατάλληλο ποσοστό του αντίστοιχου ορίου ανάληψης δράσης.

Αν ένα ενδεικτικό επίπεδο εκφράζεται σε BEQ, τα αποτελέσματα των δειγμάτων πρέπει να βρίσκονται εντός της περιοχής εργασίας και να υπερβαίνουν το όριο αναφοράς (βλέπε σημεία 7.1.1 και 7.1.6).

7.1. Αξιολόγηση της απόκρισης στη δοκιμή

7.1.1. Γενικές απαιτήσεις

— Κατά τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων σε μια καμπύλη βαθμονόμησης TCDD οι τιμές στο ανώτατο άκρο της καμπύλης θα δείχνουν σημαντική διακύμανση [μεγάλος συντελεστής μεταβλητότητας (CV)]. Η περιοχή εργασίας είναι η περιοχή στην οποία αυτός ο CV είναι μικρότερος από 15 %. Το κατώτατο άκρο της περιοχής εργασίας (όριο αναφοράς) ορίζεται τουλάχιστον σε επίπεδο τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας. Το ανώτατο άκρο της περιοχής εργασίας αντιπροσωπεύεται συνήθως από την τιμή EC₇₀ (70 % της μέγιστης πραγματικής συγκέντρωσης), αλλά είναι σε χαμηλότερο επίπεδο αν ο CV είναι υψηλότερος από το 15 % σε αυτή την περιοχή. Η περιοχή εργασίας καθορίζεται κατά την επικύρωση. Η τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.3) πρέπει να βρίσκεται εντός της περιοχής εργασίας και μακριά από τα όριά της.

— Τα πρότυπα διαλύματα και τα εκχυλίσματα των δειγμάτων υποβάλλονται σε δοκιμασία εις τριπλούν, ή τουλάχιστον εις διπλούν. Σε περίπτωση δοκιμασιών εις διπλούν, ένα πρότυπο διάλυμα ή ένα εκχύλισμα-μάρτυρας που υποβάλλεται σε δοκιμή κατανεμμένο σε τέσσερις έως έξι θήκες σε όλη την πλάκα πρέπει να δίνει απόκριση ή συγκέντρωση (δυνατόν μόνο εντός της περιοχής εργασίας) με βάση CV < 15 %.

▼ **M6**

7.1.2. Βαθμονόμηση

7.1.2.1. Βαθμονόμηση με πρότυπη καμπύλη

- Τα επίπεδα στα δείγματα πρέπει να εκτιμώνται με σύγκριση της απόκρισης στη δοκιμή με μια καμπύλη βαθμονόμησης με TCDD (ή PCB 126 ή τυποποιημένο μείγμα PCDD / PCDF / παρόμοιων με διοξίνες PCB) για τον υπολογισμό του επιπέδου BEQ στο εκχύλισμα και κατόπιν στο δείγμα.
- Η καμπύλη βαθμονόμησης περιέχει 8 έως 12 συγκεντρώσεις (τουλάχιστον εις διπλούν), με επαρκή αριθμό συγκεντρώσεων στο χαμηλότερο τμήμα της καμπύλης (περιοχή εργασίας). Αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποιότητα της προσαρμογής της καμπύλης στην περιοχή εργασίας. Οι τιμές R^2 καθαυτές έχουν μικρή ή καμία αξία για την εκτίμηση της καταλληλότητας της προσαρμογής σε μη γραμμική παλινδρόμηση. Επιτυγχάνεται καλύτερη προσαρμογή με την ελαχιστοποίηση της διαφοράς μεταξύ των υπολογιζόμενων και των παρατηρούμενων επιπέδων εντός της περιοχής εργασίας της καμπύλης (π.χ. με την εφαρμογή της μεθόδου των ελάχιστων τετραγώνων).
- Στη συνέχεια το εκτιμώμενο επίπεδο στο εκχύλισμα του δείγματος διορθώνεται ως προς το επίπεδο BEQ που υπολογίζεται για ένα τυφλό δείγμα μήτρας ή διαλύτη (για να ληφθούν υπόψη οι προσμείξεις από διαλύτες και χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν) και ως προς τη φαινόμενη ανάκτηση (που υπολογίζεται από το επίπεδο BEQ κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς με αντιπροσωπευτικά προφίλ ομοειδών ουσιών κοντά στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης). Για να γίνει η διόρθωση ως προς την ανάκτηση, η φαινόμενη ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται εντός της απαιτούμενης περιοχής τιμών (βλέπε σημείο 7.1.4). Τα δείγματα αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση ως προς την ανάκτηση πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις του σημείου 7.2.

7.1.2.2. Βαθμονόμηση με δείγματα αναφοράς

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιασμένη από τουλάχιστον τέσσερα δείγματα αναφοράς (βλέπε σημείο 7.2.4): ένα τυφλό δείγμα μήτρας συν τρία δείγματα αναφοράς με επίπεδα 0,5, 1,0 και 2,0 φορές το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πλέον ανάγκη για διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση εάν οι ιδιότητες της μήτρας των δειγμάτων αναφοράς εναρμονίζονται με εκείνες των άγνωστων δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή, η απόκριση της δοκιμής που αντιστοιχεί στα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου (βλέπε σημείο 7.3) μπορεί να υπολογιστεί άμεσα από τα δείγματα αυτά και να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αποκοπής. Για τον έλεγχο των δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης, ως τιμή αποκοπής λαμβάνεται ένα κατάλληλο ποσοστό των εν λόγω ορίων ανάληψης δράσης.

7.1.3. Ξεχωριστός προσδιορισμός των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB

Τα εκχυλίσματα μπορούν να διαχωριστούν σε κλάσματα που περιέχουν PCDD/F και παρόμοια με διοξίνες PCB, έτσι ώστε να αναφέρονται χωριστά τα επίπεδα TEQ των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB (σε BEQ). Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης των PCB 126 χρησιμοποιείται κατά προτίμηση για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για το κλάσμα που περιέχει τα παρόμοια με διοξίνες PCB.

7.1.4. Φαινόμενες ανακτήσεις βιολογικής διαδικασίας

Η «φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής διαδικασίας» υπολογίζεται από κατάλληλα δείγματα αναφοράς με αντιπροσωπευτικά προφίλ ομοειδών ουσιών, περίπου στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης, και εκφράζεται ως ποσοστό του επιπέδου BEQ σε σύγκριση με το επίπεδο TEQ. Ανάλογα με τον τύπο της δοκιμής και το σύστημα TEF⁽¹⁾ που χρησιμοποιείται, οι διαφορές μεταξύ των συντελεστών TEF και REP για τα παρόμοια με διοξίνες PCB μπορούν να προκαλέσουν

⁽¹⁾ Οι τρέχουσες απαιτήσεις βασίζονται στα TEF που δημοσιεύτηκαν στο: M. Van den Berg et al., *Toxicol Sci* 93(2), 223-241 (2006).

▼ **M6**

χαμηλά ποσοστά φαινόμενης ανάκτησης για τα παρόμοια με διοξίνες PCB σε σύγκριση με τις PCDD/F. Επομένως, σε περίπτωση ξεχωριστού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, οι ανακτήσεις βιολογικής δοκιμασίας πρέπει να είναι: για τα παρόμοια με διοξίνες PCB 20 % έως 60 % και για τις PCDD/F 50 % έως 130 % (αυτά τα εύρη τιμών ισχύουν για την καμπύλη βαθμονόμησης με TCDD). Επειδή η συμμετοχή των παρόμοιων με διοξίνες PCB στο άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών μητρών δείγματος και δειγμάτων, η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB αντανάκλα αυτά τα εύρη τιμών και κυμαίνεται μεταξύ 30 % και 130 %. Σε περίπτωση σημαντικής αναθεώρησης των τιμών TEF με επιπτώσεις για τη νομοθεσία της Ένωσης για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB, επιβάλλεται η αναθεώρηση αυτών των ευρών τιμών.

7.1.5. Έλεγχος των ποσοστών ανάκτησης για τον καθαρισμό

Η απώλεια ενώσεων κατά τη διάρκεια του καθαρισμού ελέγχεται κατά την επικύρωση. Ένα τυφλό δείγμα εμβολιασμένο με μείγμα των διαφόρων ομοειδών ουσιών υποβάλλεται σε καθαρισμό ($n = 3$ τουλάχιστον), και η ανάκτηση και η μεταβλητότητα ελέγχονται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης. Η ανάκτηση πρέπει να κυμαίνεται από 60 % έως 120 %, ιδίως για τις ομοειδείς ουσίες που συμμετέχουν σε ποσοστό πάνω από 10 % στο επίπεδο TEQ σε διάφορα μείγματα.

7.1.6. Όριο αναφοράς

Κατά τη δήλωση του επιπέδου BEQ πρέπει να καθορίζεται ένα όριο αναφοράς με βάση δείγματα με σχετική μήτρα που περιέχουν τυπικά προφίλ ομοειδών ουσιών, αλλά όχι από την καμπύλη βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων, εξαιτίας της μικρής πιστότητας στο κατώτατο άκρο της καμπύλης. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις της εκχύλισης και του καθαρισμού. Το όριο αναφοράς ορίζεται τουλάχιστον σε επίπεδο τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας.

7.2. Χρήση δειγμάτων αναφοράς

7.2.1. Τα δείγματα αναφοράς αντιπροσωπεύουν τη μήτρα του δείγματος, τα προφίλ ομοειδών ουσιών και το εύρος συγκεντρώσεων για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB κοντά στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης.

7.2.2. Σε κάθε σειρά δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνονται ένα τυφλό δείγμα μήτρας ή, αν αυτό δεν είναι δυνατόν, ένα τυφλό δείγμα διαδικασίας και ένα δείγμα αναφοράς στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης. Αυτά τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε εκχύλιση και δοκιμή ταυτόχρονα και υπό τις ίδιες συνθήκες. Το δείγμα αναφοράς πρέπει να παρουσιάζει μια σαφώς υψηλότερη απόκριση σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα, ώστε να εξασφαλίζεται η καταλληλότητα της δοκιμής. Τα εν λόγω δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διόρθωση τυφλού και ανάκτησης.

7.2.3. Τα δείγματα αναφοράς που επιλέγονται για τη διόρθωση ως προς την ανάκτηση είναι αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων της δοκιμής, πράγμα που σημαίνει ότι τα προφίλ των ομοειδών ουσιών δεν επιτρέπεται να οδηγούν σε υποεκτίμηση των επιπέδων.

7.2.4. Μπορεί να συμπεριληφθούν πρόσθετα δείγματα αναφοράς με, π.χ., 0,5 και 2 φορές το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης, ώστε να καταδειχτεί η ορθή επίδοση της δοκιμασίας στην περιοχή που ενδιαφέρει για τον έλεγχο του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης. Αυτά τα δείγματα, συνδυασμένα, μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των επιπέδων BEQ στα δείγματα δοκιμών (βλέπε σημείο 7.1.2.2).

▼ M6

7.3. Καθορισμός των τιμών αποκοπής

Καθορίζεται η σχέση μεταξύ των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων σε BEQ και των αποτελεσμάτων της μεθόδου επιβεβαίωσης σε TEQ, π.χ. με πειράματα βαθμονόμησης με αντιστοίχιση μήτρας, που περιλαμβάνουν δείγματα αναφοράς εμβολιασμένα με 0, 0,5, 1 και 2 φορές το ME, με 6 επαναλήψεις για κάθε επίπεδο ($n = 24$). Οι διορθωτικοί συντελεστές (ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) μπορούν να εκτιμηθούν από αυτή τη σχέση, αλλά πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με το σημείο 7.2.2.

Καθορίζονται τιμές αποκοπής για τη διαπίστωση της συμμόρφωσης ενός δείγματος με τα ανώτατα επίπεδα ή, στην περίπτωση ελέγχου των ορίων ανάληψης δράσης, κατά περίπτωση, της συμμόρφωσης με τα αντίστοιχα ανώτατα επίπεδα ή με το όριο ανάληψης δράσης που έχουν καθοριστεί είτε μόνο για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB είτε για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB. Εκφράζονται από το χαμηλότερο άκρο της κατανομής των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (που διορθώνονται για τυφλό και ποσοστό ανάκτησης) τα οποία αντιστοιχούν στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης βάσει επιπέδου εμπιστοσύνης 95 %, με ποσοστό ψευδώς ανταποκρινόμενων < 5 %, και $RSD_R < 25$ %. Το όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

Η τιμή αποκοπής (σε BEQ) μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με μία από τις προσεγγίσεις που καθορίζονται στα σημεία 7.3.1, 7.3.2 και 7.3.3 (βλέπε διάγραμμα 1).

7.3.1. Χρήση της χαμηλότερης περιοχής του διαστήματος πρόβλεψης 95 % στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης:

$$\text{Τιμή αποκοπής} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

όπου:

BEQ_{DL} το BEQ που αντιστοιχεί στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης, καθώς είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης

$s_{y,x}$ τυπική απόκλιση των υπολοίπων

$t_{\alpha, f = m - 2}$ ο συντελεστής Student ($\alpha = 5$ %, $f =$ βαθμοί ελευθερίας, μονόπλευρος)

m συνολικός αριθμός σημείων βαθμονόμησης (δείκτης j)

n αριθμός επαναλήψεων σε κάθε επίπεδο

x_i συγκεντρωση δείγματος (σε TEQ) του σημείου βαθμονόμησης i που προσδιορίζεται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης

$\bar{x}$ μέση τιμή των συγκεντρώσεων (σε TEQ) όλων των δειγμάτων βαθμονόμησης

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ παράμετρος του αθροίσματος των τετραγώνων, $i =$ δείκτης του σημείου βαθμονόμησης i

7.3.2. Υπολογισμός των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (με διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) πολλαπλής ανάλυσης ($n \geq 6$) δειγμάτων μολυσμένων στο επίπεδο του ορίου απόφασης με τη μέθοδο επιβεβαίωσης, ως το κατώτατο άκρο της κατανομής των δεδομένων που αντιστοιχούν στη μέση τιμή BEQ:

$$\text{Τιμή αποκοπής} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

όπου:

SD_R τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων των βιολογικών δοκιμασιών σε BEQ_{DL} , μετρημένα σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας εντός εργαστηρίου

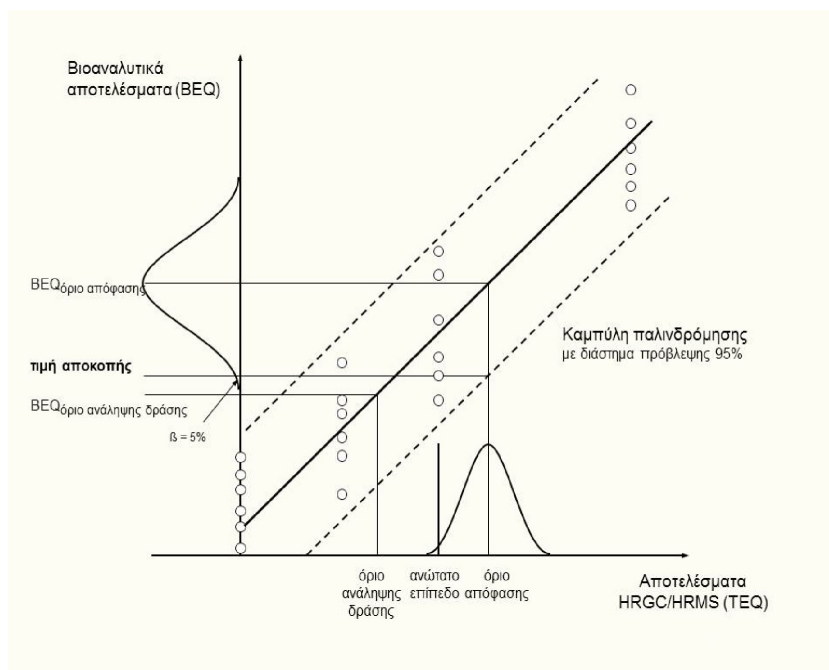
▼ **M6**

7.3.3. Υπολογισμός ως μέση τιμή των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (σε BEQ, με διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) από πολλαπλή ανάλυση ($n \geq 6$) δειγμάτων μολυσμένων σε επίπεδο ίσο με τα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης· αυτή η διαδικασία βασίζεται στην παρατήρηση ότι αυτό το επίπεδο θα είναι περίπου η τιμή αποκοπής που προσδιορίζεται στο σημείο 7.3.1 ή στο σημείο 7.3.2:

Ο υπολογισμός των τιμών αποκοπής με βάση επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %, με ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων $< 5 \%$ και $RSD_R < 25 \%$:

- 1) από το *κατώτατο* σημείο του διαστήματος πρόβλεψης 95 % στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης,
- 2) από πολλαπλή ανάλυση ($n \geq 6$) δειγμάτων μολυσμένων στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης ως το *κατώτατο* άκρο της κατανομής των δεδομένων (που απεικονίζεται στο διάγραμμα με κωδωνοειδή καμπύλη) στην αντίστοιχη μέση τιμή BEQ.

Σχήμα 1



7.3.4. Περιορισμοί των τιμών αποκοπής

Οι τιμές αποκοπής βάσει των BEQ που υπολογίζονται από την RSD_R και επιτυγχάνονται κατά την επικύρωση με τη χρήση περιορισμένου αριθμού δειγμάτων με διαφορετική μήτρα/προφίλ ομοειδών ουσιών μπορεί να είναι υψηλότερες από τα ανώτατα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης βάσει των TEQ λόγω της μεγαλύτερης πιστότητας από εκείνη που επιτυγχάνεται συνήθως όταν πρέπει να ελεγχθεί ένα άγνωστο φάσμα πιθανών προφίλ ομοειδών ουσιών. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι τιμές αποκοπής υπολογίζονται από μια $RSD_R = 25 \%$, ή προτιμώνται τα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης.

7.4. *Χαρακτηριστικά επιδόσεων*

7.4.1. Δεδομένου ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εσωτερικά πρότυπα σε βιοαναλυτικές μεθόδους, πραγματοποιούνται δοκιμές επαναληψιμότητας για να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την τυπική απόκλιση εντός σειρών δοκιμών και μεταξύ σειρών δοκιμών. Η επαναληψιμότητα πρέπει να είναι κάτω από 20 % και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα κάτω από 25 %. Αυτά βασίζονται στα υπολογιζόμενα επίπεδα σε BEQ μετά τη διόρθωση τυφλού και ποσοστού ανάκτησης.

▼ **M6**

- 7.4.2. Στο πλαίσιο της διαδικασίας επικύρωσης πρέπει να αποδεικνύεται ότι η δοκιμή μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ ενός τυφλού δείγματος και ενός επιπέδου ίσου με την τιμή αποκοπής, επιτρέποντας έτσι την ταυτοποίηση των δειγμάτων που υπερβαίνουν την αντίστοιχη τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.1.2).
- 7.4.3. Ορίζονται οι ενώσεις-στόχοι, οι πιθανές παρεμποδίσεις και τα μέγιστα ανεκτά επίπεδα τυφλού.
- 7.4.4. Η επί τοις εκατό τυπική απόκλιση της απόκρισης ή της συγκέντρωσης, που υπολογίζεται με βάση την απόκριση (είναι δυνατό μόνον εντός της περιοχής τιμών εργασίας) σε τριπλό προσδιορισμό με εκχύλισμα δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 %.
- 7.4.5. Τα μη διορθωμένα αποτελέσματα για το (τα) δείγμα(-τα) αναφοράς, σε BEQ (τυφλό και στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάλυσης δράσης), χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επίδοσης της βιοαναλυτικής μεθόδου για σταθερή περίοδο.
- 7.4.6. Τα διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου για τα τυφλά δείγματα διαδικασίας και κάθε είδος δείγματος αναφοράς καταγράφονται και ελέγχονται ώστε να εξασφαλίζεται ότι η αναλυτική επίδοση είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις, ιδίως όσον αφορά την απαιτούμενη ελάχιστη διαφορά από το κατώτατο άκρο της περιοχής τιμών εργασίας για τα τυφλά δείγματα διαδικασίας και όσον αφορά την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα για τα δείγματα αναφοράς. Τα τυφλά δείγματα διαδικασίας πρέπει να ελέγχονται κατά τρόπον ώστε να αποφεύγονται τα ψευδοσυμμορφούμενα αποτελέσματα κατά την αφαίρεση των επιπέδων των δειγμάτων αυτών.
- 7.4.7. Τα αποτελέσματα από τις μεθόδους επιβεβαίωσης των δειγμάτων για τα οποία υπάρχει υπόνοια ότι δεν συμμορφώνονται και του 2 % έως 10 % των δειγμάτων που συμμορφώνονται (τουλάχιστον 20 δείγματα ανά μήτρα δείγματος) συγκεντρώνονται και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επίδοσης της μεθόδου διαλογής και της σχέσης μεταξύ BEQ και TEQ. Αυτή η βάση δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιείται για την επαναξιολόγηση των τιμών αποκοπής που εφαρμόζονται στα δείγματα ρουτίνας για τις επικυρωμένες μήτρες.
- 7.4.8. Η επιτυχής επίδοση μιας μεθόδου μπορεί επίσης να αποδειχθεί με τη συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα που αναλύονται στις διεργαστηριακές δοκιμές και καλύπτουν εύρος συγκεντρώσεων έως και, π.χ., το διπλάσιο του ανώτατου επιπέδου, μπορούν επίσης να συμπεριλαμβάνονται στην αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων, εφόσον ένα εργαστήριο είναι σε θέση να αποδείξει την επιτυχία του επίδοσης. Τα δείγματα πρέπει να καλύπτουν τα συχνότερα προφίλ ομοειδών ουσιών και να αντιπροσωπεύουν διάφορες πηγές.
- 7.4.9. Κατά τη διάρκεια των περιστατικών οι τιμές αποκοπής μπορούν να αξιολογηθούν εκ νέου, και να αντανakλούν την ειδική μήτρα και το ειδικό προφίλ ομοειδών ουσιών αυτού του συγκεκριμένου περιστατικού.

8. Αναφορά των αποτελεσμάτων**8.1. Μέθοδοι επιβεβαίωσης**

- 8.1.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιέχουν τα επίπεδα των μεμονωμένων ομοειδών ουσιών των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και οι τιμές TEQ αναφέρονται ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο, προκειμένου να περιλαμβάνουν τον ανώτατο αριθμό πληροφοριών στην αναφορά των αποτελεσμάτων και να διευκολύνεται έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τις ειδικές απαιτήσεις.
- 8.1.2. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

▼ **M6**

- 8.1.3. Οι ανακτήσεις των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να καθίστανται διαθέσιμες στην περίπτωση που οι ανακτήσεις είναι εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 6.2.5, στην περίπτωση που υπερβαίνεται το ανώτατο επίπεδο (στην περίπτωση αυτή, οι ανακτήσεις για μία από τις δύο αναλύσεις εις διπλούν) και σε άλλες περιπτώσεις κατόπιν σχετικής αίτησης.
- 8.1.4. Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης πρέπει να αναφέρεται, επειδή η παράμετρος αυτή πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν κρίνεται αν ένα δείγμα συμμορφώνεται ή όχι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να αναφέρονται ως « $x \pm U$ », όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης, χρησιμοποιώντας συντελεστή κάλυψης 2, ο οποίος δίνει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Σε περίπτωση χωριστού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, πρέπει να χρησιμοποιείται για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB το άθροισμα των εκτιμήσεων της διευρυμένης αβεβαιότητας των χωριστών αναλυτικών αποτελεσμάτων για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB.
- 8.1.5. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/EK.
- 8.2. *Βιοαναλυτικές μέθοδοι διαλογής*
- 8.2.1. Το αποτέλεσμα της διαλογής εκφράζεται ως «συμμορφούμενο» ή «πιθανώς μη συμμορφούμενο» («ύποπτο»).
- 8.2.2. Επιπλέον, μπορεί να αναφέρεται ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα για τις PCDD/F και/ή τα παρόμοια με διοξίνες PCB, εκφρασμένο σε BEQ (και όχι TEQ).
- 8.2.3. Τα δείγματα με απόκριση χαμηλότερη από το όριο αναφοράς αναφέρονται με την ένδειξη «κάτω από το όριο αναφοράς». Τα δείγματα με απόκριση πάνω από την περιοχή τιμών εργασίας δηλώνονται ως «πάνω από την περιοχή τιμών εργασίας» και το επίπεδο που αντιστοιχεί στο άνω άκρο της περιοχής τιμών εργασίας πρέπει να δίνεται σε BEQ.
- 8.2.4. Για κάθε είδος μήτρας δείγματος η έκθεση αναφέρει το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάλυσης δράσης στο οποίο βασίζεται η αξιολόγηση.
- 8.2.5. Η έκθεση αναφέρει τον τύπο της εφαρμοζόμενης δοκιμής, τη βασική αρχή της και το είδος της βαθμονόμησης.
- 8.2.6. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.
- 8.2.7. Στην περίπτωση δειγμάτων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι μη συμμορφούμενα, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει σημείωση σχετικά με τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν. Η συγκέντρωση των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στα δείγματα με υψηλά επίπεδα πρέπει να προσδιοριστεί/επιβεβαιωθεί με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.
- 8.2.8. Τα μη συμμορφούμενα αποτελέσματα δηλώνονται μόνο μέσω της ανάλυσης επιβεβαίωσης.
- 8.3. *Φυσικοχημικές μέθοδοι διαλογής*
- 8.3.1. Το αποτέλεσμα της διαλογής εκφράζεται ως «συμμορφούμενο» ή «πιθανώς μη συμμορφούμενο» («ύποπτο»).
- 8.3.2. Για κάθε είδος μήτρας δείγματος η έκθεση αναφέρει το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάλυσης δράσης στο οποίο βασίζεται η αξιολόγηση.

▼ **M6**

- 8.3.3. Επιπλέον, μπορεί να δίνονται τα επίπεδα των μεμονωμένων ομοειδών ουσιών των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και οι τιμές TEQ ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/EK.
- 8.3.4. Οι ανακτήσεις των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να καθίστανται διαθέσιμες στην περίπτωση που οι ανακτήσεις είναι εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 6.2.5, στην περίπτωση που υπερβαίνεται το ανώτατο επίπεδο (στην περίπτωση αυτή, οι ανακτήσεις για μία από τις δύο αναλύσεις εις διπλούν) και σε άλλες περιπτώσεις κατόπιν σχετικής αίτησης.
- 8.3.5. Η έκθεση αναφέρει τη μέθοδο GC-MS που εφαρμόζεται.
- 8.3.6. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.
- 8.3.7. Στην περίπτωση δειγμάτων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι μη συμμορφούμενα, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει σημείωση σχετικά με τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν. Η συγκέντρωση των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στα δείγματα με υψηλά επίπεδα πρέπει να προσδιοριστεί/επιβεβαιωθεί με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.
- 8.3.8. Η μη συμμόρφωση μπορεί να αποφασίζεται μόνον έπειτα από ανάλυση επιβεβαίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

Προετοιμασία των δειγμάτων και απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB σε ζωοτροφές

1. Πεδίο εφαρμογής

Οι απαιτήσεις που καθορίζονται στο παρόν κεφάλαιο εφαρμόζονται στις αναλύσεις ζωοτροφών για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB καθώς και όσον αφορά την προετοιμασία δειγμάτων και τις αναλυτικές απαιτήσεις για άλλους κανονιστικούς σκοπούς, στους οποίους περιλαμβάνονται οι έλεγχοι που εκτελούνται από τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για να εξασφαλιστεί η συμμόρφωση με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 183/2005.

2. Εφαρμοζόμενες μέθοδοι ανίχνευσης

Αεριοχρωματογραφία / Ανίχνευση σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ή ισοδύναμες μέθοδοι.

3. Ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των προσδιοριζόμενων ουσιών που ενδιαφέρουν

- 3.1. Ο σχετικός χρόνος κατακράτησης σε σχέση με τα εσωτερικά πρότυπα ή πρότυπα αναφοράς (αποδεκτή απόκλιση $\pm 0,25\%$).
- 3.2. Ο διαχωρισμός με αεριοχρωματογραφία των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB από παρεμποδιστές, κυρίως συνεκλυόμενα PCB, ιδίως αν τα επίπεδα των δειγμάτων είναι στο επίπεδο των νόμιμων ορίων και πρέπει να επιβεβαιωθεί η μη συμμόρφωση⁽¹⁾.
- 3.3. Απαιτήσεις για τις τεχνικές GC-MS

Παρακολούθηση τουλάχιστον του ακόλουθου αριθμού μοριακών ιόντων ή χαρακτηριστικών ιόντων από τη μοριακή συστάδα:

- α) δύο ειδικών ιόντων για την HRMS·

⁽¹⁾ Ομοειδείς ουσίες που διαπιστώνεται συχνά ότι είναι συνεκλυόμενες είναι, παραδείγματος χάρι, τα PCB 28/31, PCB 52/69 και PCB 138/163/164. Για τη μέθοδο GC-MS επίσης λαμβάνονται υπόψη πιθανές παρεμποδίσεις από θραύσματα ομοειδών ουσιών ανώτερου βαθμού χλωρίωσης.

▼ **M6**

β) τριών ειδικών ιόντων για την LRMS·

γ) δύο ειδικών μητρικών ιόντων, καθένα με ένα συγκεκριμένο αντίστοιχο θυγατρικό ιόν μετάβασης για MS-MS.

Μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές ανοχής για τους λόγους αφθονίας των επιλεγμένων θραυσμάτων μαζών:

Η σχετική απόκλιση του λόγου αφθονίας των επιλεγμένων θραυσμάτων μαζών από τη θεωρητική αφθονία ή το πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης για στοχευόμενο ιόν (το πιο πολυπληθές ιόν που παρακολουθείται) και προσδιοριστικό(-ά) ιόν(-ντα): $\pm 15 \%$

3.4. Απαιτήσεις για τις τεχνικές GC/ECD

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που υπερβαίνουν το ανώτατο επίπεδο με δύο στήλες GC με στατικές φάσεις διαφορετικής πολικότητας.

4. Απόδειξη της επίδοσης της μεθόδου

Επικύρωση της επίδοσης της μεθόδου στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου (0,5 έως 2 φορές το ανώτατο επίπεδο) με αποδεκτό συντελεστή μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες αναλύσεις (βλέπε απαιτήσεις για ενδιάμεση ακρίβεια στο σημείο 9).

5. Όριο ποσοτικού προσδιορισμού

Το άθροισμα των LOQ ⁽¹⁾ των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB δεν είναι υψηλότερο από το ένα τρίτο του ανώτατου επιπέδου ⁽²⁾.

6. Έλεγχος ποιότητας

Τακτικοί έλεγχοι τυφλών δειγμάτων, αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων, δείγματα ποιοτικού ελέγχου, συμμετοχή σε διεργαστηριακές μελέτες για σχετικές μήτρες.

7. Έλεγχος ανακτήσεων

7.1. Χρήση κατάλληλων εσωτερικών προτύπων με φυσικοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με των προσδιοριζόμενων ουσιών που ενδιαφέρουν.

7.2. Προσθήκη εσωτερικών προτύπων:

Προσθήκη στα προϊόντα (πριν από τη διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού).

7.3. Οι απαιτήσεις για τις μεθόδους που χρησιμοποιούν και τα έξι ομοειδή μη παρόμοια με διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση:

α) διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων·

β) ανακτήσεις των εσωτερικών προτύπων με ισοτοπική επισήμανση από 60 % έως 120 %·

γ) είναι αποδεκτά χαμηλότερα ή υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για τις επιμέρους ομοειδείς ουσίες με συμμετοχή στο άθροισμα των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB μικρότερη από 10 %.

7.4. Οι απαιτήσεις για τις μεθόδους που δεν χρησιμοποιούν και τα έξι εσωτερικά πρότυπα με ισοτοπική επισήμανση ή άλλα εσωτερικά πρότυπα:

α) έλεγχος της ανάκτησης του (των) εσωτερικού(-ών) προτύπου(-ων) για κάθε δείγμα·

⁽¹⁾ Οι αρχές όπως περιγράφονται στο «Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την εκτίμηση LOD και LOQ για μετρήσεις στον τομέα των μολυντών των ζωοτροφών και των τροφίμων» (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) τηρούνται, κατά περίπτωση.

⁽²⁾ Συνιστάται ιδιαίτερα η συμμετοχή του σήματος του τυφλού δείγματος να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλά σε σχέση με το επίπεδο ενός μολυντή σε ένα δείγμα. Ο έλεγχος της μεταβλητότητας των επιπέδων τυφλού, κυρίως αν τα επίπεδα τυφλού αφαιρούνται από το αποτέλεσμα, αποτελεί αρμοδιότητα του εργαστηρίου.

▼ M6

β) ανακτήσεις των εσωτερικών προτύπων από 60 % έως 120 %·

γ) διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων.

- 7.5. Οι ανακτήσεις των ομοειδών ουσιών ελέγχονται με εμβολιασμένα δείγματα ή δείγματα ποιοτικού ελέγχου με συγκεντρώσεις στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου. Τα ποσοστά ανάκτησης γι' αυτές τις ομοειδείς ουσίες θεωρούνται αποδεκτά εάν κυμαίνονται μεταξύ 60 % και 120 %.

8. Απαιτήσεις για τα εργαστήρια

Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 882/2004, η διαπίστευση των εργαστηρίων γίνεται από αναγνωρισμένο οργανισμό που λειτουργεί σύμφωνα με τον οδηγό ISO 58, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα εργαστήρια εφαρμόζουν μεθόδους διασφάλισης της ποιότητας. Η διαπίστευση των εργαστηρίων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025. Επιπλέον, οι αρχές που περιγράφονται στις «Τεχνικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και τα όρια ποσοτικοποίησης για ανάλυση PCDD/F και PCB» τηρούνται κατά περίπτωση ⁽¹⁾.

9. Χαρακτηριστικά επιδόσεων: κριτήρια για το σύνολο των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB στο ανώτατο επίπεδο

	Φασματομετρία μάζας αραίωσης ισotόπων ⁽¹⁾	Άλλες τεχνικές
Ορθότητα	− 20 % έως + 20 %	− 30 % έως + 30 %
Ενδιάμεση πιστότητα (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Διαφορά μεταξύ άνω φραγμένου και κάτω φραγμένου υπολογισμού	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Χρήση και των έξι αναλόγων με επισήμανση ¹³C ως απαιτούμενων εσωτερικών προτύπων.

10. Αναφορά των αποτελεσμάτων

- 10.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιλαμβάνουν τα επίπεδα των μεμονωμένων μη παρόμοιων με διοξίνες PCB και το άθροισμα των εν λόγω ομοειδών ουσιών PCB, ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο, προκειμένου να παρέχονται όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες στην αναφορά των αποτελεσμάτων και να διευκολύνεται έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τις ειδικές απαιτήσεις.
- 10.2. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCB.
- 10.3. Τα ποσοστά ανάκτησης των επιμέρους εσωτερικών προτύπων πρέπει να αναφέρονται σε περίπτωση που βρίσκονται εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 7, σε περίπτωση υπέρβασης του ανώτατου επιπέδου, καθώς και σε άλλες περιπτώσεις, κατόπιν σχετικής αίτησης.
- 10.4. Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης πρέπει να αναφέρεται, επειδή η εν λόγω παράμετρος πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν κρίνεται αν ένα δείγμα συμμορφώνεται ή όχι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να αναφέρονται ως «x ± U», όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης, χρησιμοποιώντας συντελεστή κάλυψης 2, ο οποίος δίνει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.
- 10.5. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ.

⁽¹⁾ Οι τρέχουσες απαιτήσεις βασίζονται στα TEF που δημοσιεύτηκαν στο: M. Van den Berg et al., *Toxicol Sci* 93(2), 223-241 (2006).

▼ **M2***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI***ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΟΝ ΕΠΙΣΗΜΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ****1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ**

Ο προσδιορισμός των συστατικών ζωικής προέλευσης στις ζωοτροφές πρέπει να διενεργείται με οπτική μικροσκοπία ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με τις διατάξεις που προβλέπονται στο παρόν παράρτημα.

Αυτές οι δύο μέθοδοι καθιστούν εφικτή την ανίχνευση της παρουσίας συστατικών ζωικής προέλευσης σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές. Ωστόσο, δεν επιτρέπουν τον υπολογισμό της ποσότητας των εν λόγω συστατικών σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές. Αμφότερες οι μέθοδοι έχουν όριο ανίχνευσης κάτω από 0,1 % (w/w).

Η μέθοδος PCR καθιστά εφικτό τον καθορισμό της ταξινομικής ομάδας των συστατικών ζωικής προέλευσης που είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές.

Αυτές οι μέθοδοι θα εφαρμόζονται για τον έλεγχο της εφαρμογής των απαγορεύσεων που προβλέπονται στο άρθρο 7 παράγραφος 1 και στο παράρτημα IV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 999/2001, καθώς και στο άρθρο 11 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1069/2009.

Ανάλογα με το είδος των ζωοτροφών που υποβάλλονται σε δοκιμή, οι εν λόγω μέθοδοι μπορεί να χρησιμοποιούνται —στο πλαίσιο ενός και μόνου πρωτοκόλλου λειτουργίας— είτε χωριστά είτε από κοινού, σύμφωνα με τις τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP) που έχουν καταρτιστεί από το εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για τις ζωικές πρωτεΐνες στις ζωοτροφές (EURL-AP) και έχουν αναρτηθεί στον δικτυακό του τόπο ⁽¹⁾.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ**2.1. Οπτική μικροσκοπία****2.1.1. ► M7 Αρχή**

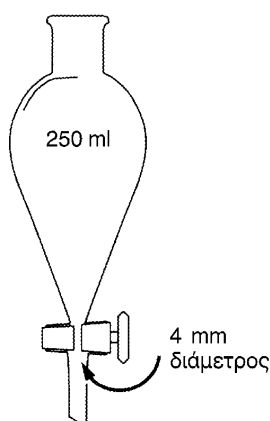
Τα συστατικά ζωικής προέλευσης που μπορεί να είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σε σύνθετες ζωοτροφές που αποστέλλονται προς ανάλυση ταυτοποιούνται με βάση τυπικά χαρακτηριστικά τα οποία είναι ταυτοποιήσιμα με χρήση μικροσκοπίου, όπως μυϊκές ίνες και άλλα σωματίδια κρέατος, χόνδροι, οστά, κέρατα, τρίχες, χνούδι, αίμα, σφαιρίδια γάλακτος, κρύσταλλοι λακτόζης, φτερά, κελύφη αυγών, ψαροκόκαλα και λέπια. ◀

2.1.2. Αντιδραστήρια και συσκευές**2.1.2.1. Αντιδραστήρια****2.1.2.1.1. Παράγοντας συμπύκνωσης****2.1.2.1.1.1. Τετραχλωροαιθυλένιο (σχετική πυκνότητα 1,62)****2.1.2.1.2. Αντιδραστήριο χρώσης****2.1.2.1.2.1. Διάλυμα ερυθρού της αλιζαρίνης (Αραιώνονται 2,5 ml υδροχλωρικού οξέος 1M σε 100 ml νερού και στο διάλυμα προστίθενται 200 mg ερυθρού της αλιζαρίνης.)****2.1.2.1.3. Μονιμοποιητικά μέσα****2.1.2.1.3.1. Αλισίβα (NaOH 2,5 % w/v ή KOH 2,5 % w/v)**

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2. ► **M7** Γλυκερόλη (χωρίς αραίωση, ιξώδες: 1 490 cP) ή μονιμοποιητικό μέσο με ισοδύναμες ιδιότητες για μη μόνιμο παρασκεύασμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα ◀
- 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (ιξώδες: 1 200 cP) ή ρητίνη με ισοδύναμες ιδιότητες για μονιμοποίηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα
- 2.1.2.1.4. Μονιμοποιητικά μέσα με ιδιότητες χρώσης
- 2.1.2.1.4.1. Διάλυμα Lugol (Αραιώνονται 2 g ιωδιούχου καλίου σε 100 ml νερού και προστίθεται 1 g ιωδίου με συχνή ανακίνηση.)
- 2.1.2.1.4.2. Αντιδραστήριο κυστίνης (2 g οξικού μολύβδου, 10 g NaOH/100 ml νερού)
- 2.1.2.1.4.3. Αντιδραστήριο Fehling (παρασκευάζεται, για άμεση χρήση, από ίσα μέρη (1/1) δύο αρχικών διαλυμάτων Α και Β. Διάλυμα Α: Αραιώνονται 6,9 g θειικού χαλκού πενταένδρου σε 100 ml νερού. Διάλυμα Β: Αραιώνονται 34,6 g τρυγού καλίου νατρίου τετραϋδρικού και 12 g NaOH σε 100 ml νερού.)
- 2.1.2.1.4.4. Τετραμεθυλοβενζιδίνη/Υπεροξειδίου του υδρογόνου. (Αραιώνεται 1 g 3,3',5,5' τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB) σε 100 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος και 150 ml νερού. Πριν από τη χρήση, αναμειγνύονται 4 μέρη αυτού του διαλύματος TMB με 1 μέρος 3 % υπεροξειδίου του υδρογόνου.)
- 2.1.2.1.5. Παράγοντες έκπλυσης
- 2.1.2.1.5.1. Αιθανόλη ≥ 96 % (τεχνικής ποιότητας)
- 2.1.2.1.5.2. Ακετόνη (τεχνικής ποιότητας)
- 2.1.2.1.6. Αντιδραστήριο λεύκανσης
- 2.1.2.1.6.1. Εμπορικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (9-14 % ενεργό χλώριο)
- 2.1.2.2. Εξοπλισμός
- 2.1.2.2.1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0,001 g
- 2.1.2.2.2. ► **M7** Εξοπλισμός άλεσης: μαχαίρι ή περιστρεφόμενος μύλος. Αν χρησιμοποιείται περιστρεφόμενος μύλος, δεν επιτρέπονται κόσκινα $\leq 0,5$ mm ◀
- 2.1.2.2.3. ► **M7** Κόσκινα με τετράγωνα διάκενα ανοίγματος 0,25 mm και 1 mm. Με εξαίρεση το προκοσκίνισμα του δείγματος, η διάμετρος των κόσκινων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 cm προκειμένου να αποφεύγεται η απώλεια υλικών. Δεν απαιτείται βαθμονόμηση των κόσκινων ◀
- 2.1.2.2.4. Γυάλινη κωνική διαχωριστική χοάνη με χωρητικότητα 250 ml και, στη βάση της, στρόφιγγα από Teflon ή εσφυρισμένο γυαλί. Η διάμετρος ανοίγματος της στρόφιγγας θα πρέπει να είναι ≥ 4 mm. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα, με την προϋπόθεση ότι το εργαστήριο έχει αποδείξει ότι τα επίπεδα ανίχνευσης είναι ισοδύναμα με εκείνα που επιτυγχάνονται με τη χρήση γυάλινης κωνικής διαχωριστικής χοάνης.

Χοάνη διαχωρισμού

▼ **M2**

- 2.1.2.2.5. Στερεομικροσκόπιο που καλύπτει τελική κλίμακα μεγέθυνσης από τουλάχιστον 6,5× έως 40×
- 2.1.2.2.6. Σύνηθετο μικροσκόπιο που καλύπτει τελική κλίμακα μεγέθυνσης τουλάχιστον 100× έως 400×, με εκπεμπόμενο φως φωτεινού πεδίου. Μπορούν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν πολωμένο φως και διαφορική παρεμβαλλόμενη αντίθεση.
- 2.1.2.2.7. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη
- 2.1.2.2.8. Εξοπλισμός για προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών: αντικειμενοφόρες πλάκες κλασικού μικροσκοπίου, κοίλες αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες (20×20 mm), λαβίδες και λεπτές σπάτουλες

▼ **M7**

- 2.1.2.2.9. Κλίβανος εργαστηρίου
- 2.1.2.2.10. Φυγοκεντρικός διαχωριστήρας
- 2.1.2.2.11. Διηθητικό χαρτί ποιοτικό φίλτρο κυτταρίνης (μέγεθος πόρων 4-11 μm)

▼ **M2**

- 2.1.3. *Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος*
- 2.1.3.1. ► **M7** Δειγματοληψία
Χρησιμοποιείται αντιπροσωπευτικό δείγμα, το οποίο λαμβάνεται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος I του παρόντος κανονισμού. ◀
- 2.1.3.2. Απαραίτητες προφυλάξεις
Για την πρόληψη διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο εργαστήριο, κάθε επαναχρησιμοποιούμενος εξοπλισμός πρέπει να καθαρίζεται επιμελώς πριν από τη χρήση. Τα εξαρτήματα της διαχωριστικής χοάνης πρέπει να αποσυναρμολογούνται πριν από τον καθαρισμό τους. Τα εξαρτήματα της διαχωριστικής χοάνης και τα γυάλινα σκεύη πρέπει να προπλένονται στο χέρι και μετά να πλένονται σε πλυντήριο. Τα κόσκινα πρέπει να καθαρίζονται με βούρτσα με σκληρές συνθετικές τρίχες. Μετά το κοσκίνισμα λιπαρών υλικών, όπως το ιχθυάλευρο, συνιστάται τελικός καθαρισμός των κοσκίνων με ακετόνη και πιεσμένο αέρα.
- 2.1.3.3. Παρασκευή δειγμάτων άλλων από λίπη ή έλαια
- 2.1.3.3.1. ► **M7** Αποξήρανση δειγμάτων: τα δείγματα με περιεκτικότητα σε υγρασία > 14 % πρέπει να ξηραίνονται προτού χρησιμοποιηθούν σύμφωνα με το παράρτημα III του παρόντος κανονισμού. ◀
- 2.1.3.3.2. ► **M7** Προκοσκίνισμα δειγμάτων: με σκοπό τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με πιθανή περιβαλλοντική μόλυνση της ζωοτροφής, συνιστάται το προκοσκίνισμα σε 1 mm σύμπτυκτων ζωοτροφών και κόκκων και, στη συνέχεια, η παρασκευή και ανάλυση των δύο τμημάτων που προκύπτουν ως χωριστών δειγμάτων. ◀
- 2.1.3.3.3. Επιμέρους δειγματοληψία και άλεση: Τουλάχιστον 50 g του δείγματος πρέπει να αποτελούν αντικείμενο επιμέρους δειγματοληψίας για ανάλυση και μεταγενέστερη άλεση.
- 2.1.3.3.4. Εκχύλιση και προετοιμασία του ιζήματος: Ποσότητα 10 g (ακρίβεια 0,01 g) του αλεσμένου επιμέρους δείγματος μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη ή στο ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα και προστίθενται 50 ml τετραχλωροαιθυλένιο. Η ποσότητα που μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη περιορίζεται σε 3 g στην περίπτωση ιχθυαλεύρων ή άλλων καθαρών ζωικών προϊόντων, μεταλλικών συστατικών ή προμειγμάτων που παράγουν ίζημα περισσότερο από 10 %. Το μείγμα ανακινείται έντονα για τουλάχιστον 30 s και προστίθενται προσεκτικά τουλάχιστον 50 ml τετραχλωροαιθυλένιο επιπλέον, ενώ εκπλένεται η εσωτερική επιφάνεια της χοάνης προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα. Το μείγμα που προκύπτει αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 5 λεπτά προτού το ίζημα διαχωριστεί πλήρως με το άνοιγμα της στρόφιγγας. Αν χρησιμοποιείται ποτήρι ζέσεως με κωνικό πυθμένα, το μείγμα αναδεύεται έντονα για τουλάχιστον 15 s, ενώ τυχόν κατάλοιπα που παραμένουν στα τοιχώματα του ποτηριού εκπλένονται προσεκτικά από την εσωτερική επιφάνεια με τουλάχιστον 10 ml καθαρού τετραχλωροαιθυλένιο. Το μείγμα αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 3 λεπτά και στη συνέχεια ανακινείται εκ νέου για 15 δευτερόλεπτα, ενώ τυχόν κατάλοιπα που παραμένουν στα τοιχώματα του ποτηριού εκπλένονται προσεκτικά από την εσωτερική επιφάνεια με τουλάχιστον 10 ml καθαρού τετραχλωροαιθυλένιο. Το μείγμα που προκύπτει αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 5 λεπτά και τότε το υγρό κλάσμα απομακρύνεται και απορρίπτεται με προσεκτική απόχυση, ώστε να μη χαθεί ποσότητα από το ίζημα.

▼ **M7**

Το ίζημα συλλέγεται σε διηθητικό χαρτί τοποθετημένο σε χοάνη, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός του εναπομείναντος TCE, αποφεύγοντας παράλληλα την εναπόθεση λίπους στο ίζημα. Το ίζημα ξηραίνεται. Στη συνέχεια συνιστάται η ζύγιση του ιζήματος (ακρίβεια 0,001 g) για τον έλεγχο του σταδίου της ιζηματοποίησης. Τέλος, το ίζημα κοσκινίζεται σε 0,25 mm κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση, εκτός αν το κοσκίνισμα δεν κρίνεται αναγκαίο.

▼ **M2**

2.1.3.3.5. Εκχύλιση και προετοιμασία του επιπλεύσματος: Μετά την ανάκτηση του ιζήματος με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω, στη διαχωριστική χοάνη θα πρέπει να μένουν δύο φάσεις: μια υγρή φάση, αποτελούμενη από τετραχλωροαιθυλένιο, και μια στερεή φάση, αποτελούμενη από το υλικό που επιπλέει. Αυτή η στερεή φάση είναι το επίπλευσμα και ανακτάται με την πλήρη έκχυση του τετραχλωροαιθυλένιο από τη χοάνη με το άνοιγμα της στρόφιγγας. Αφού αναστραφεί η διαχωριστική χοάνη, το επίπλευσμα μεταφέρεται σε ένα μεγάλο τρυβλίο Petri και αποξηραίνεται με αέρα σε συλλέκτη καπνών. Αν ποσοστό του επιπλεύσματος μεγαλύτερο από 5 % αποτελείται από σωματίδια > 0,50 mm, κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση.

2.1.3.3.6. Προετοιμασία των πρώτων υλών: Παρασκευάζεται ποσότητα τουλάχιστον 5 g του αλεσμένου επιμέρους δείγματος. Αν ποσοστό της πρώτης ύλης μεγαλύτερο από 5 % αποτελείται από σωματίδια > 0,50 mm, κοσκινίζεται σε 0,25 mm και τα δύο κλάσματα που προκύπτουν υποβάλλονται σε εξέταση.

2.1.3.4. Παρασκευή δειγμάτων που αποτελούνται από λίπη ή έλαια

Το ακόλουθο πρωτόκολλο εφαρμόζεται για την παρασκευή δειγμάτων που αποτελούνται από λίπη ή έλαια:

- αν το λίπος είναι στερεό, θερμαίνεται σε φούρνο έως ότου υγροποιηθεί,
- με τη χρήση πιπέτας, μεταφέρονται 40 ml λίπους ή ελαίου από τον πυθμένα του δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρησης,
- πραγματοποιείται φυγοκέντρηση επί 10 λεπτά σε 4 000 r.p.m.,
- αν το λίπος είναι στερεό μετά τη φυγοκέντρηση, θερμαίνεται σε φούρνο έως ότου υγροποιηθεί,
- επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση επί 5 λεπτά σε 4 000 r.p.m.,
- με τη χρήση μικρού κουταλιού ή σπάτουλας, το ήμισυ των προσμείξεων που έχουν αποχυθεί μεταφέρεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου προς εξέταση· ως μονιμοποιητικό μέσο συνιστάται η γλυκερόλη,
- οι υπόλοιπες προσμείξεις χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του ιζήματος, με τον τρόπο που περιγράφεται στο σημείο 2.1.3.3.

2.1.3.5. Χρήση αντιδραστηρίων χρώσης

Για να διευκολυνθεί η ορθή ταυτοποίηση των συστατικών ζωικής προέλευσης, ο χειριστής μπορεί να χρησιμοποιήσει αντιδραστήρια χρώσης κατά την παρασκευή του δείγματος σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές που έχουν εκδοθεί από το EURL-AP και έχουν αναρτηθεί στον δικτακό του τόπο.

Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται διάλυμα ερυθρού της αλιζαρίνης για τη χρώση του ιζήματος, εφαρμόζεται το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- το αποξηραμένο ίζημα μεταφέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και εκπλένεται δύο φορές με περίπου 5 ml αιθανόλης (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s· ο διαλύτης αφήνεται να κατακαθίσει για περίπου 1 min 30 s και αποχύνεται),
- το ίζημα υποβάλλεται σε λεύκανση με την προσθήκη τουλάχιστον 1 ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου. Η αντίδραση αφήνεται να εξελιχθεί για 10 min. Ο σωλήνας γεμίζει με νερό, το ίζημα αφήνεται να κατακαθίσει για 2-3 min, και το νερό μαζί με τα αιωρούμενα σωματίδια αποχύνονται με ήπιο τρόπο,

▼ **M2**

- το ίζημα εκπλένεται δύο ακόμα φορές με περίπου 10 ml νερού (χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s, αφήνεται να κατακαθίσει και το νερό αποχύνεται κάθε φορά),
- προστίθενται 2 έως 10 σταγόνες διαλύματος ερυθρού της αλιζαρίνης και το μείγμα αναμειγνύεται. Η αντίδραση αφήνεται να συντελεστεί για 30 s και το χρωματισμένο ίζημα εκπλένεται δύο φορές με περίπου 5 ml αιθανόλης και μετά εκπλένεται μία φορά με ακετόνη (κάθε φορά χρησιμοποιείται αναμεικτής vortex για 30 s· ο διαλύτης αφήνεται να κατακαθίσει για περίπου 1 min και αποχύνεται),
- το χρωματισμένο ίζημα αποξηραίνεται.

2.1.4. *Μικροσκοπική εξέταση*

2.1.4.1. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

▼ **M7**

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου προετοιμάζονται από το ίζημα και, ανάλογα με την επιλογή του χειριστή, είτε από το επίπλευσμα είτε από την πρώτη ύλη.

▼ **M2**

Προετοιμάζεται επαρκής αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών ώστε να εξασφαλιστεί ότι μπορεί να εκτελεστεί πλήρες πρωτόκολλο εξέτασης, όπως προβλέπεται στο σημείο 2.1.4.2.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου μονιμοποιούνται με το κατάλληλο μονιμοποιητικό μέσο σύμφωνα με την τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καλύπτονται με καλυπτρίδες.

▼ **M7**

2.1.4.2. Διάγραμμα ροής παρατηρήσεων για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε σύνθετες ζωοτροφές και πρώτες ύλες ζωοτροφών

Οι προετοιμασμένες αντικειμενοφόρες πλάκες υποβάλλονται σε παρατήρηση σύμφωνα με τα διαγράμματα ροής παρατηρήσεων που παρουσιάζονται στα σχήματα 1 και 2.

Οι παρατηρήσεις διενεργούνται με τη χρήση του απλού μικροσκοπίου στο ίζημα και, ανάλογα με την επιλογή του χειριστή, είτε στο επίπλευσμα είτε στην πρώτη ύλη. Το διόφθαλμο μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιείται επιπλέον του απλού μικροσκοπίου για τα χονδρόκοκκα κλάσματα. Κάθε αντικειμενοφόρος πλάκα εξετάζεται πλήρως σε διάφορες μεγεθύνσεις. Ακριβείς επεξηγήσεις σχετικά με τον τρόπο χρήσης των διαγραμμάτων ροής παρατηρήσεων παρατίθενται λεπτομερώς σε μια τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον ιστότοπό του.

Ο ελάχιστος αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών που πρέπει να παρακολουθείται σε κάθε στάδιο του διαγράμματος ροής παρατηρήσεων πρέπει να τηρείται απολύτως, εκτός αν ολόκληρο το υλικό του κλάσματος δεν επιτρέπει την επίτευξη του καθορισμένου αριθμού αντικειμενοφόρων πλακών, π.χ. όταν δεν λαμβάνεται ίζημα. Για την καταγραφή του αριθμού των σωματιδίων δεν χρησιμοποιούνται περισσότερες από 6 αντικειμενοφόρες πλάκες ανά προσδιορισμό.

Όταν προετοιμάζονται πρόσθετες αντικειμενοφόρες πλάκες στο επίπλευσμα ή στην πρώτη ύλη με τη χρήση πιο ειδικού μονιμοποιητικού μέσου με ιδιότητες χρώσης, όπως ορίζεται στο σημείο 2.1.2.1.4, για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό δομών (π.χ. φτερά, τρίχες, μυϊκά σωματίδια ή σωματίδια αίματος) που έχουν ανιχνευθεί σε αντικειμενοφόρες πλάκες που έχουν προετοιμαστεί από άλλα μονιμοποιητικά μέσα, όπως ορίζονται στο σημείο 2.1.2.1.3, ο αριθμός των σωματιδίων υπολογίζεται με βάση έναν αριθμό αντικειμενοφόρων πλακών ανά προσδιορισμό που δεν υπερβαίνει τις 6, συμπεριλαμβανομένων των πρόσθετων αντικειμενοφόρων πλακών με πιο ειδικό μονιμοποιητικό μέσο.

Για να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση της φύσης και της προέλευσης των σωματιδίων, ο χειριστής μπορεί να χρησιμοποιήσει βοηθητικά εργαλεία, όπως συστήματα στήριξης αποφάσεων, συλλογές φωτογραφιών και δείγματα αναφοράς.

▼ **M7**

Σχήμα 1

Διάγραμμα ροής παρατηρήσεων για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε σύνθετες ζωοτροφές και πρώτες ύλες ζωοτροφών για τον πρώτο προσδιορισμό

(Τα D1 και D2 αναφέρονται στον πρώτο και τον δεύτερο προσδιορισμό· *: χερσαία σπονδυλωτά, ψάρια)

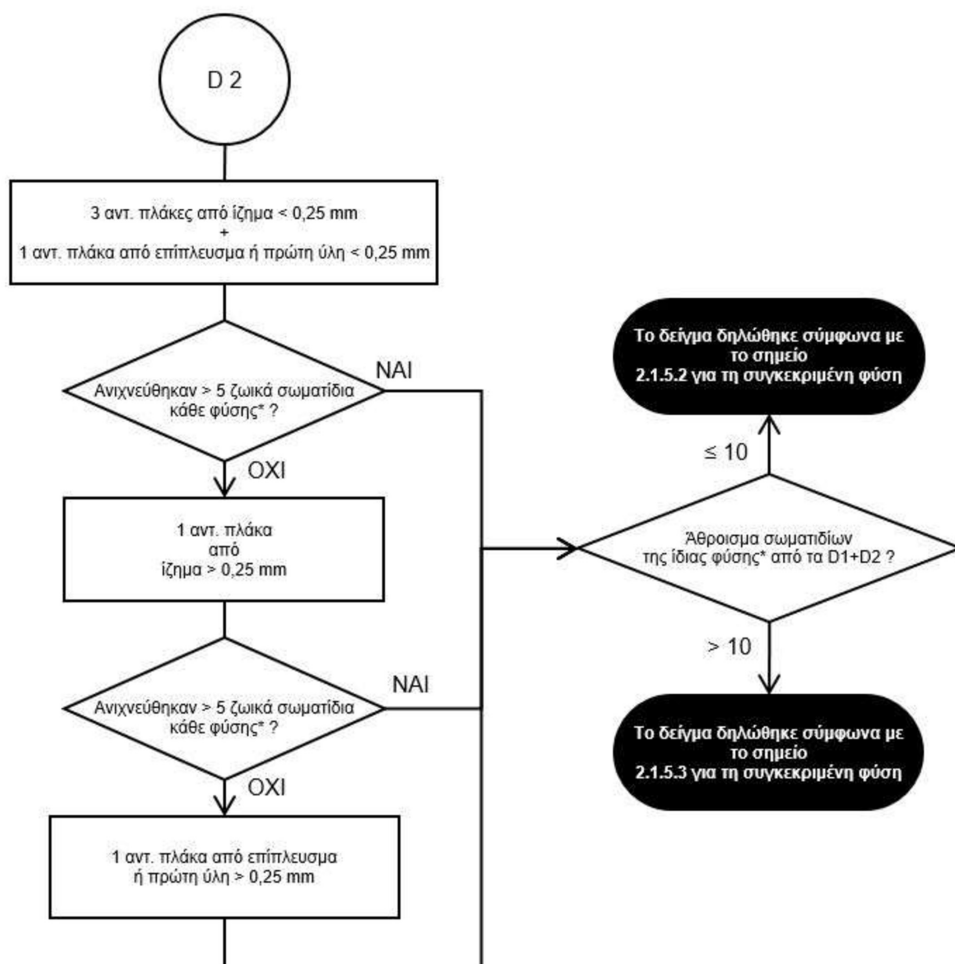


▼ **M7**

Σχήμα 2

Διάγραμμα ροής παρατηρήσεων για την ανίχνευση ζωικών σωματιδίων σε σύνθετες ζωοτροφές και πρώτες ύλες ζωοτροφών για τον δεύτερο προσδιορισμό

(Τα D1 και D2 αναφέρονται στον πρώτο και τον δεύτερο προσδιορισμό· *: χερσαία σπονδυλωτά, ψάρια)



▼ **M2**2.1.4.3. ► **M7** Αριθμός προσδιορισμών

Οι προσδιορισμοί διενεργούνται σε διαφορετικά επιμέρους δείγματα 50 g έκαστο.

Αν, μετά τη διενέργεια του πρώτου προσδιορισμού σύμφωνα με το διάγραμμα ροής παρατηρήσεων του σχήματος 1, δεν ανιχνευθούν ζωικά σωματίδια, δεν είναι αναγκαίος πρόσθετος προσδιορισμός και το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.1.

Αν, μετά τη διενέργεια του πρώτου προσδιορισμού σύμφωνα με το διάγραμμα ροής παρατηρήσεων του σχήματος 1, ανιχνευθούν ένα ή περισσότερα ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης (π.χ. χερσαίων σπονδυλωτών ή ψαριών) και η φύση των σωματιδίων που ανιχνεύθηκαν επιβεβαιώνει το δηλωθέν περιεχόμενο του δείγματος, δεν είναι αναγκαίος δεύτερος προσδιορισμός. Αν ο αριθμός των ζωικών σωματιδίων συγκεκριμένης φύσης που ανιχνεύθηκαν κατά τον πρώτο προσδιορισμό είναι μεγαλύτερος από 5, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται βάσει της φύσης των ζωικών σωματιδίων με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.3. Διαφορετικά, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται βάσει της φύσης των ζωικών σωματιδίων με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.2.

Σε άλλες περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της περίπτωσης κατά την οποία δεν έχει υποβληθεί στο εργαστήριο δήλωση περιεχομένου, διενεργείται δεύτερος σε νέο επιμέρους δείγμα.

Αν, μετά τη διενέργεια του δεύτερου προσδιορισμού σύμφωνα με το διάγραμμα ροής παρατηρήσεων του σχήματος 2, ο συνολικός αριθμός των ζωικών σωματιδίων συγκεκριμένης φύσης που ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς είναι μεγαλύτερος από 10, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται βάσει της φύσης των ζωικών σωματιδίων με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.3. Διαφορετικά, το αποτέλεσμα της ανάλυσης καταγράφεται βάσει της φύσης των ζωικών σωματιδίων με την ορολογία που προβλέπεται στο σημείο 2.1.5.2. ◀

2.1.5. ► **M7** Έκφραση των αποτελεσμάτων

Κατά την καταγραφή των αποτελεσμάτων, το εργαστήριο επισημαίνει τον τύπο του υλικού επί του οποίου διενεργήθηκε η ανάλυση (ίζημα, επίπλευσμα ή πρώτη ύλη). Στην έκθεση αναφέρεται σαφώς ο αριθμός των προσδιορισμών που διενεργήθηκαν και τυχόν κοσκίνισμα των κλασμάτων πριν από την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών, σύμφωνα με το τελευταίο εδάφιο του σημείου 2.1.3.3.4.

Η έκθεση του εργαστηρίου πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία συστατικών που προέρχονται από χερσαία σπονδυλωτά και από ψάρια.

Οι διάφορες περιπτώσεις πρέπει να αναφέρονται με τους ακόλουθους τρόπους.

2.1.5.1. Δεν ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης:

— «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε κανένα σωματίδιο προερχόμενο από χερσαία σπονδυλωτά.»

— «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε κανένα σωματίδιο προερχόμενο από ψάρια.»

▼ M2

2.1.5.2. Ανιχνεύθηκαν από 1 έως 5 ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης κατά τη διενέργεια ενός μόνο προσδιορισμού ή ανιχνεύθηκαν από 1 έως 10 σωματίδια συγκεκριμένης φύσης στην περίπτωση δύο προσδιορισμών [ο αριθμός των ανιχνευθέντων σωματιδίων είναι μικρότερος από το όριο απόφασης στις τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP) του εργαστηρίου αναφοράς της ΕΕ για τις ζωικές πρωτεΐνες στις ζωοτροφές (EURL-AP) και δημοσιεύεται στον ιστότοπό του] ⁽¹⁾:

Αν έχει διενεργηθεί μόνο ένας προσδιορισμός:

- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 5 σωματίδια προερχόμενα από χερσαία σπονδυλωτά. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων είναι κάτω του ορίου απόφασης που έχει καθοριστεί για την εν λόγω μικροσκοπική μέθοδο.»
- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 5 σωματίδια προερχόμενα από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων είναι κάτω του ορίου απόφασης που έχει καθοριστεί για την εν λόγω μικροσκοπική μέθοδο.»

Αν έχουν διενεργηθεί δύο προσδιορισμοί:

- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς περισσότερα από 10 σωματίδια προερχόμενα από χερσαία σπονδυλωτά. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων είναι κάτω του ορίου απόφασης που έχει καθοριστεί για την εν λόγω μικροσκοπική μέθοδο.»
- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς περισσότερα από 10 σωματίδια προερχόμενα από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.]. Αυτή η παρουσία μικρών ποσοτήτων είναι κάτω του ορίου απόφασης που έχει καθοριστεί για την εν λόγω μικροσκοπική μέθοδο.»

Επιπλέον:

- Σε περίπτωση προκοσκινίσματος του δείγματος, η έκθεση του εργαστηρίου επισημαίνει το κλάσμα (κοσκινισμένο κλάσμα, σύμπηκτο κλάσμα ή κόκκοι) στο οποίο ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια, στον βαθμό που η ανίχνευση ζωικών σωματιδίων μόνο στο κοσκινισμένο κλάσμα μπορεί να αποτελεί σημάδι μόλυνσης του περιβάλλοντος.
- Σε περίπτωση ανίχνευσης μόνο ζωικών σωματιδίων που δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως χερσαία σπονδυλωτά είτε ως ψάρια (π.χ. μυϊκές ίνες), πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση ότι ανιχνεύθηκαν μόνο τα εν λόγω ζωικά σωματίδια και ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η προέλευσή τους από χερσαία σπονδυλωτά.

2.1.5.3. Ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 5 ζωικά σωματίδια συγκεκριμένης φύσης κατά τη διενέργεια ενός μόνο προσδιορισμού ή ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 10 σωματίδια συγκεκριμένης φύσης στην περίπτωση δύο προσδιορισμών:

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

Αν έχει διενεργηθεί μόνο ένας προσδιορισμός:

- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 5 σωματίδια προερχόμενα από χερσαία σπονδυλωτά. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.]»
- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν περισσότερα από 5 σωματίδια προερχόμενα από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.]»

Αν έχουν διενεργηθεί δύο προσδιορισμοί:

- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς περισσότερα από 10 σωματίδια προερχόμενα από χερσαία σπονδυλωτά. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [οστά, χόνδροι, μύες, τρίχες, κέρατα κ.λπ.]»
- «στον βαθμό που ήταν διακριτό με φωτομικροσκόπιο, στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκαν κατά τους δύο προσδιορισμούς περισσότερα από 10 σωματίδια προερχόμενα από ψάρια. Τα σωματίδια ταυτοποιήθηκαν ως ... [ψαροκόκκαλα, λέπια, χόνδροι, μύες, ωτόλιθοι, βράγχια κ.λπ.]»

Επιπλέον:

- Σε περίπτωση προκοσκινίσματος του δείγματος, η έκθεση του εργαστηρίου επισημαίνει το κλάσμα (κοσκινισμένο κλάσμα, σύμπηκτο κλάσμα ή κόκκοι) στο οποίο ανιχνεύθηκαν ζωικά σωματίδια, στον βαθμό που η ανίχνευση ζωικών σωματιδίων μόνο στο κοσκινισμένο κλάσμα μπορεί να αποτελεί σημάδι μόλυνσης του περιβάλλοντος.
- Σε περίπτωση ανίχνευσης μόνο ζωικών σωματιδίων που δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως χερσαία σπονδυλωτά είτε ως ψάρια (π.χ. μυϊκές ίνες), πρέπει να αναφέρεται στην έκθεση ότι ανιχνεύθηκαν μόνο τα εν λόγω ζωικά σωματίδια και ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η προέλευσή τους από χερσαία σπονδυλωτά. ◀

2.2. **PCR**

2.2.1. *Αρχή*

Τα θραύσματα δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) ζωικής προέλευσης που μπορεί να είναι παρόντα σε πρώτες ύλες ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές ανιχνεύονται με τεχνική γονιδιακής ενίσχυσης μέσω PCR, στοχοθετώντας αλληλουχίες DNA ειδικές για κάθε είδος ζώου.

Η μέθοδος PCR απαιτεί, κατά πρώτον, εκχύλιση DNA. Το στάδιο της ενίσχυσης εφαρμόζεται ακολούθως στο εκχύλισμα DNA που έχει αποκτηθεί μ' αυτόν τον τρόπο, προκειμένου να ανιχνευθεί το ζωικό είδος που στοχοθετείται από τη δοκιμή.

2.2.2. *Αντιδραστήρια και εξοπλισμός*

2.2.2.1. *Αντιδραστήρια*

2.2.2.1.1. *Αντιδραστήρια για το στάδιο της εκχύλισης DNA*

Χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια εγκεκριμένα από το EURL-AP και δημοσιευμένα στον δικτυακό του τόπο.

2.2.2.1.2. *Αντιδραστήρια για το στάδιο της γονιδιακής ενίσχυσης*

▼ M2

- 2.2.2.1.2.1. Εκκινητές και ανιχνευτές
Χρησιμοποιούνται μόνο εκκινητές και ανιχνευτές με αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν επικυρωθεί από το EURL-AP ⁽¹⁾.
- 2.2.2.1.2.2. Master Mix
Χρησιμοποιούνται μόνο διαλύματα Master Mix που δεν περιέχουν αντιδραστήρια ικανά να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω της παρουσίας ζωικού DNA ⁽²⁾.
- 2.2.2.1.2.3. Αντιδραστήρια απομόλυνσης
- 2.2.2.1.2.3.1. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,1 N).
- 2.2.2.1.2.3.2. Λευκαντικό (διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου σε 0,15 % ενεργού χλωρίου)
- 2.2.2.1.2.3.3. Μη διαβρωτικά αντιδραστήρια για την απομόλυνση δαπανηρών συσκευών, όπως οι αναλυτικοί ζυγοί (π.χ. DNA EraseTM της MP Biomedicals)
- 2.2.2.2. Εξοπλισμός
- 2.2.2.2.1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0,001 g
- 2.2.2.2.2. Εξοπλισμός άλεσης
- 2.2.2.2.3. Θερμικός κυκλοποιητής για την επίτευξη PCR πραγματικού χρόνου
- 2.2.2.2.4. Μικροφυγοκεντρητής για σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης
- 2.2.2.2.5. Σετ από μικροπιπέτες για τη μεταφορά ποσότητας από 1 μl έως 1 000 μl
- 2.2.2.2.6. Τυποποιημένος πλαστικός εξοπλισμός μοριακής βιολογίας: σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης, πλαστικά ρύγχη με φίλτρο για μικροπιπέτες, δίσκοι κατάλληλοι για θερμικό κυκλοποιητή
- 2.2.2.2.7. Καταψύκτες για την αποθήκευση δειγμάτων και αντιδραστηρίων
- 2.2.3. *Δειγματοληψία και παρασκευή δείγματος*
- 2.2.3.1. Δειγματοληψία
Χρησιμοποιείται αντιπροσωπευτικό δείγμα, που λαμβάνεται σύμφωνα με τις διατάξεις που προβλέπονται στο παράρτημα I.
- 2.2.3.2. Προετοιμασία του δείγματος
Η προετοιμασία εργαστηριακών δειγμάτων έως την εκχύλιση DNA πρέπει να πληρεί τις απαιτήσεις του παραρτήματος II. Για την ανάλυση και, στη συνέχεια, το άλεσμα πρέπει να συλλέγεται επιμέρους δείγμα τουλάχιστον 50 g του δείγματος.
Η προετοιμασία του δείγματος πρέπει να διενεργείται σε χώρο διαφορετικό από εκείνους όπου πραγματοποιείται αποκλειστικά η εκχύλιση DNA και η γονιδιακή ενίσχυση, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276.
Προετοιμάζονται δύο τμήματα προς δοκιμή τουλάχιστον 100 mg έκαστο.
- 2.2.4. *Εκχύλιση DNA*
Η εκχύλιση DNA διενεργείται σε κάθε τμήμα προς δοκιμή που έχει προετοιμαστεί με τη χρήση της SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο.
Προετοιμάζονται δύο μάρτυρες εκχύλισης για κάθε σειρά εκχύλισης, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276:
— ένας αρνητικός μάρτυρας εκχύλισης,
— ένας θετικός μάρτυρας εκχύλισης DNA.

⁽¹⁾ Ο κατάλογος αυτών των εκκινητών και ανιχνευτών για κάθε ζωικό είδος που στοχεύεται από τη δοκιμή διατίθεται στον δικτυακό τόπο του EURL-AP.

⁽²⁾ Παραδείγματα διαλυμάτων Master Mix που είναι λειτουργικά διατίθενται στον δικτυακό τόπο του EURL-AP.

▼ **M2**2.2.5. *Γονιδιακή ενίσχυση*

Η γονιδιακή ενίσχυση διενεργείται με τις επικυρωμένες μεθόδους για κάθε είδος που απαιτεί ταυτοποίηση. Αυτές οι μέθοδοι προβλέπονται στη SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο. Κάθε εκχύλισμα DNA αναλύεται τουλάχιστον σε δύο διαφορετικά διαλύματα, ώστε να αξιολογηθεί η αναστολή.

Προετοιμάζονται δύο μάρτυρες ενίσχυσης ανά στοχοθετημένο είδος, όπως περιγράφεται στο πρότυπο ISO 24276:

- χρησιμοποιείται θετικός μάρτυρας του DNA-στόχου για κάθε δίσκο ή σειρά δοκιμών PCR,
- χρησιμοποιείται μάρτυρας του αντιδραστηρίου ενίσχυσης (γνωστός και ως δείγμα αναφοράς χωρίς DNA) για κάθε δίσκο ή σειρά δοκιμών PCR.

2.2.6. *Ερμηνεία και έκφραση των αποτελεσμάτων*

Κατά την καταγραφή των αποτελεσμάτων, το εργαστήριο επισημαίνει τουλάχιστον το βάρος των τμημάτων δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν, τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόστηκε, τον αριθμό προσδιορισμών που διεξήχθησαν και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ερμηνεύονται και να καταγράφονται αν ο θετικός μάρτυρας εκχύλισης DNA και ο θετικός μάρτυρας του DNA-στόχου δεν παράγουν θετικά αποτελέσματα για τον υπό δοκιμή στόχο, ενώ ο μάρτυρας του αντιδραστηρίου ενίσχυσης είναι αρνητικός.

Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα από τα δύο τμήματα δοκιμής δεν συμφωνούν μεταξύ τους, πρέπει να επαναλαμβάνεται τουλάχιστον η φάση της γονιδιακής ενίσχυσης. Αν το εργαστήριο υποπτεύεται ότι τα εκχυλίσματα DNA μπορεί να είναι η αιτία της ασυμφωνίας, διενεργούνται νέα εκχύλιση DNA και, στη συνέχεια, γονιδιακή ενίσχυση πριν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η τελική έκφραση των αποτελεσμάτων βασίζεται στην ενσωμάτωση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δύο τμημάτων δοκιμής, σύμφωνα με τη SOP που έχει θεσπίσει το EURL-AP και δημοσιεύεται στον δικτυακό του τόπο.

2.2.6.1. *Αρνητικό αποτέλεσμα*

Το αρνητικό αποτέλεσμα καταγράφεται ως εξής:

Στο δείγμα που εξετάστηκε δεν ανιχνεύθηκε DNA από X (όπου X είναι το ζωικό είδος ή η ομάδα ζωικών ειδών που στοχοθετείται από τη δομική).

2.2.6.2. *Θετικό αποτέλεσμα*

Το θετικό αποτέλεσμα καταγράφεται ως εξής:

Στο δείγμα που εξετάστηκε ανιχνεύθηκε DNA από X (όπου X είναι το ζωικό είδος ή η ομάδα ζωικών ειδών που στοχοθετείται από τη δομική).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

**ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ
ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΤΡΟΦΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ**
1. Μέθοδος υπολογισμού και έκφραση της ενεργειακής αξίας

Η ενεργειακή αξία των συνθέτων τροφών που προορίζονται για πουλερικά υπολογίζεται σύμφωνα με τον κατωτέρω τύπο, βάσει των ποσοστών ορισμένων αναλυτικών συστατικών των τροφών· η αξία αυτή εκφράζεται σε megajoules (MJ), μεταβολίσιμης ενέργειας (ME), διορθωμένης για το άζωτο, ανά χιλιόγραμμα σύνθετης τροφής ως έχει:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ ακατέργαστης πρωτεΐνης} + 0,3431 \times \% \text{ ακατέργαστες λιπαρές ουσίες} + 0,1669 \times \% \text{ άμυλο} + 0,1301 \times \% \text{ ολικά ζάχαρα}$$

(εκφρασμένα σε ζαχαρόζη).

2. Όρια ανοχής που εφαρμόζονται στις δηλωθείσες αξίες

Εάν, μετά από τους επισήμους ελέγχους διαπιστώνεται διαφορά μεταξύ του αποτελέσματος του ελέγχου και της ενεργειακής αξίας που έχει δηλωθεί, η οποία συνιστά αύξηση ή μείωση της ενεργειακής αξίας της τροφής, εφαρμόζεται ανοχή της μεταβολίσιμης ενέργειας κατά 0,4 MJ/kg ME τουλάχιστον.

3. Έκφραση του αποτελέσματος

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από την εφαρμογή του ανωτέρω τύπου δηλώνεται με προσέγγιση ενός δεκαδικού ψηφίου.

4. Τρόποι δειγματοληψίας και εφαρμοζόμενες μέθοδοι ανάλυσης

Η δειγματοληψία της σύνθετης τροφής και οι περιεκτικότητες σε αναλυτικά συστατικά που δηλώνονται στη μέθοδο υπολογισμού πραγματοποιούνται αντίστοιχα ανάλογα με τις κοινοτικές μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών.

Εφαρμόζεται:

- για την περιεκτικότητα σε ακατέργαστες λιπαρές ουσίες: η διαδικασία Β της μεθόδου για τον προσδιορισμό των ακατέργαστων ελαίων και λιπών, όπως ορίζεται στο μέρος Η του παραρτήματος ΙΙΙ,
- για τις περιεκτικότητες σε άμυλο: η διαθλασματική μέθοδος, όπως ορίζεται στο μέρος ΙΒ του παραρτήματος ΙΙΙ.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

**ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΑΡΑΝΟΜΗΣ
ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΣΕ ΜΗ ΕΓΓΕΚΡΙΜΕΝΕΣ
ΠΛΕΟΝ ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΥΛΕΣ**

Σημαντική σημείωση:

Είναι δυνατή η χρήση πιο ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης από τις μεθόδους που αναφέρονται στο παρόν παράρτημα για την ανίχνευση της παράνομης περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε μη εγκεκριμένες πλέον πρόσθετες ύλες.

Οι μέθοδοι ανάλυσης που αναφέρονται στο παρόν παράρτημα χρησιμοποιούνται για λόγους επιβεβαίωσης.

A. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΜΕΘΥΛ-ΜΠΕΝΖΟΚΟΥΕΙΤ

7-βενζυλοξη-6-βουτυλ-3-μεθοξυκαρβονυλ-4-κινολόνη

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της ουσίας μεθυλ-μπενζοκουέιτ στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 1 mg/kg.

2. Αρχή

Η ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ λαμβάνεται από το δείγμα με εκχύλιση με μεθανολικό διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος. Το εκχύλισμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με διχλωρομεθάνιο διά ιοντοεναλλακτικής χρωματογραφίας και εν συνεχεία πάλι με διχλωρομεθάνιο. Η περιεκτικότητα σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ προσδιορίζεται με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) ανάστροφης φάσης με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. Αντιδραστήρια**3.1. Διχλωρομεθάνιο****3.2. Μεθανόλη καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC****3.3. Κινητή φάση HPLC**

Μείγμα μεθανόλης (3.2) και νερού (καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC) 75 + 25 (v+v).

Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο πάχους 0,22 μm (4.5) και αφαιρούνται τα αέρια (π.χ. μέσω έκθεσης σε υπερίχους επί 10 λεπτά).

3.4. Διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος, c = 2 %

Διαλύονται 20,0 ml μεθανοσουλφονικού οξέος σε 1 000 ml μεθανόλης (3.2).

3.5. Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, c = 10 %

Διαλύονται 100 ml υδροχλωρικού οξέος (ρ₂₀ 1,18 g/ml) σε 1 000 ml νερού.

3.6. Ιοντοεναλλακτική ρητίνη κατιόντων Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

Η ρητίνη υποβάλλεται σε προκαταρκτική επεξεργασία. Αναμειγνύονται 100 γραμμάρια ρητίνης με 500 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5) και θερμαίνονται μέχρι βρασμού πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα υπό συνεχή ανάδευση. Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει και αποχύνεται το οξύ. Διηθούμε μέσω διηθητικού χάρτη υπό κενό. Εκπλύνουμε τη ρητίνη δύο φορές με 500 ml νερού κάθε φορά και εν συνεχεία με 250 ml μεθανόλης (3.2). Εκπλύνουμε τη ρητίνη μια ακόμη φορά με 250 ml μεθανόλης και ξηραίνουμε με αέρα που διέρχεται μέσω του στερεού υπολείμματος της διήθησης. Η αποξηραμένη ρητίνη φυλάσσεται σε πωματισμένη φιάλη.

3.7. Πρότυπη ουσία: καθαρή μεθυλ-μπενζοκουέιτ (7-βενζυλοξη-6-βουτυλ-3-μεθοξυκαρβονυλ-4-κινολόνη)

▼B

- 3.7.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα της ουσίας μεθυλ-μπενζο-κουέιτ, 500 µg/ml

Ζυγίζουμε 50 mg της πρότυπης ουσίας (3.7) με ακρίβεια 0,1 mg, διαλύουμε σε διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) σε βαθμονομημένη φιάλη των 100 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

- 3.7.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα της ουσίας μεθυλ-μπενζοκουέιτ, 50 µg/ml

Μεταφέρουμε 5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος μεθυλ-μπενζοκουέιτ (3.7.1) σε βαθμονομημένη φιάλη των 50 ml, συμπληρώνουμε με μεθανόλη (3.2) μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

- 3.7.3. Διαλύματα αναφοράς

Μεταφέρουμε 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml και 5,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος μεθυλ-μπενζοκουέιτ (3.7.2) σε βαθμολογημένες φιάλες των 25 ml. Συμπληρώνουμε με την κινητή φάση (3.3) μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ είναι αντιστοίχως 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 6,0 µg/ml, 8,0 µg/ml και 10,0 µg/ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

4. Όργανα

- 4.1. Αναδευτήρας εργαστηρίου
- 4.2. Περιστρεφόμενος εξαμιστήρας υμενίου
- 4.3. Υάλινη στήλη (250 mm × 15 mm), εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με δεξαμενή χωρητικότητας 200 ml περίπου
- 4.4. Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με συστοιχία διόδων ως ανιχνευτή
- 4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με πληρωτικό υλικό C₁₈ πάχους 10 µm ή ισοδύναμη
- 4.5. Διηθητικές μεμβράνες 0,22 µm
- 4.6. Διηθητικές μεμβράνες 0,45 µm

5. Διαδικασία

5.1. Γενικά

- 5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σε αυτό ούτε η ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ ούτε άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.
- 5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής το οποίο θα έχει εμπλουτιστεί με προσθήκη ποσότητας μεθυλ-μπενζοκουέιτ παραπλήσιας εκείνης του δείγματος. Για εμπλουτισμό μέχρι 15 mg/kg, προσθέτουμε 600 µl του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) σε 20 g του τυφλού δείγματος ζωοτροφής, αναμειγνύουμε και περιμένουμε επί 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου προς εκείνον του δείγματος και κατά την ανάλυση δεν πρέπει να ανιχνεύεται μεθυλ-μπενζοκουέιτ.

5.2. Εκχύλιση

Ζυγίζονται περί τα 20 g του παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,01 g και εισάγονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Προστίθενται 100,0 ml του διαλύματος μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) και ακολουθεί μηχανική ανατάραξη (4.1) επί 30 λεπτά. Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη και το διήθημα φυλάσσεται για το στάδιο διαχωρισμού υγρού-υγρού (5.3).

5.3. Διαχωρισμός υγρού-υγρού

Εντός διαχωριστικής χοάνης των 500 ml όπου περιέχονται 100 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5), εισάγονται 25,0 ml του διηθήματος που ελήφθη κατά το στάδιο (5.2). Προστίθενται στη χοάνη 100 ml διχλωρομεθανίου (3.1) και ακολουθεί ανατάραξη επί 1 λεπτό. Αφήνεται να επέλθει διαχωρισμός των στοιβάδων και αποχύνεται η υποκείμενη στοιβάδα (διχλωρομεθάνιο) εντός σφαιρικής φιάλης με σφαιρικό

▼ B

πυθμένα και όγκου 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της υδατικής φάσης με δύο ακόμη ποσότητες διχλωρομεθανίου των 40 ml και τα εκχυλίσματα εισάγονται στη σφαιρική φιάλη μαζί με το πρώτο εκχύλισμα. Το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου αφήνεται να εξατμισθεί μέχρι πλήρους ξηράνσης στον περιστροφικό εξατμιστήρα (4.2), σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 20-25 ml μεθανόλης (3.2), πωματίζεται η φιάλη και φυλάσσεται το σύνολο του εκχυλίσματος για το στάδιο της ιοντοεναλλακτικής χρωματογραφίας (5.4).

5.4. Ιοντοεναλλακτική χρωματογραφία

5.4.1. Προετοιμασία της στήλης ανταλλαγής κατιόντων

Τοποθετείται βύσμα από υαλοβάμβακα στο κάτω μέρος μιας υάλινης στήλης (4.3). Παρασκευάζεται μείγμα 5,0 g της προεπεξεργασμένης ρητίνης ανταλλαγής κατιόντων (3.6) με 50 ml υδροχλωρικού οξέος (3.5), εισάγεται στη γυάλινη στήλη και αφήνεται να ηρεμήσει. Απορρίπτεται το πλεονάζον οξύ μέχρις ότου η στάθμη του φθάσει ακριβώς πάνω από την επιφάνεια της ρητίνης και η στήλη εκπλύνεται με νερό μέχρι την ουδετέρη αντίδραση του εκρέοντος υγρού με το χάρτι του ηλιοτροπίου. Εισάγονται πάνω στη στήλη 50 ml μεθανόλης (3.2) και αφήνονται να φθάσουν μέχρι την επιφάνεια της ρητίνης.

5.4.2. Χρωματογραφία στήλης

Με ένα σιφόνιο εισάγεται προσεκτικά πάνω στη στήλη το εκχύλισμα που ελήφθη κατά το στάδιο (5.3). Εκπλύνεται η σφαιρική φιάλη με δύο ποσότητες μεθανόλης (3.2) των 5-10 ml και τα υπολείμματα της έκπλυσης μεταφέρονται στη στήλη. Αφήνεται το εκχύλισμα να ρεύσει μέχρι την επιφάνεια της ρητίνης και εκπλύνεται η στήλη με 50 ml μεθανόλης κατά τρόπον ώστε ο ρυθμός της ροής να μην υπερβαίνει τα 5 ml ανά min. Το εκρέον υγρό απορρίπτεται. Εκλούεται η μεθυλ-μπενζοκουέιτ από τη στήλη με 150 ml διαλύματος μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) και το υγρό της έκλουσης συλλέγεται από τη στήλη μέσα σε κωνική φιάλη των 250 ml.

5.5. Διαχωρισμός υγρού-υγρού

Εισάγεται το υγρό της έκλουσης το οποίο ελήφθη κατά το στάδιο (5.4.2) εντός διαχωριστικής χοάνης του 1 λίτρου. Εκπλύνεται η κωνική φιάλη με 5-10 ml μεθανόλης (3.2) και τα υπολείμματα της έκλουσης αναμειγνύονται με το περιεχόμενο της διαχωριστικής χοάνης. Προστίθενται 300 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5) και 130 ml διχλωρομεθανίου (3.1). Ακολουθεί ανατάραξη επί 1 λεπτό και αφήνεται να επέλθει διαχωρισμός των φάσεων. Αποχύνεται η κατώτερη στοιβάδα (διχλωρομεθάνιο) εντός σφαιρικής φιάλης με σφαιρικό πυθμένα και όγκου 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της υδατικής φάσης με δύο επιπλέον ποσότητες διχλωρομεθανίου των 70 ml και τα εκχυλίσματα εισάγονται μαζί με το πρώτο στη σφαιρική φιάλη.

Αφήνεται να εξατμιστεί το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου μέχρι πλήρους ξηράνσης στον περιστροφικό εξατμιστήρα (4.2) σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση. Διαλύεται το υπόλειμμα της φιάλης με περίπου 5 ml μεθανόλης (3.2) και το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά σε βαθμονομημένη φιάλη των 10 ml. Εκπλύνεται η σφαιρική φιάλη με δύο ακόμη ποσότητες μεθανόλης 1-2 ml και τα υπολείμματα της έκπλυσης μεταφέρονται στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή και ακολουθεί ανάμειξη. Μέρος του εν λόγω υγρού διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης (4.6). Το εν λόγω διάλυμα φυλάσσεται για τον προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (5.6).

5.6. Προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC

5.6.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες είναι απλώς ενδεικτικές-ισοδύναμα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν και υπό άλλες συνθήκες:

- Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.4.1),
- Κινητή φάση HPLC: Μείγμα μεθανόλης-νερού (3.3),
- Ρυθμός ροής: 1-1,5 ml/min,
- Μήκος κύματος ανίχνευσης: 265 nm,
- Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 20-50 μl.

▼B

Ελέγχεται η σταθερότητα της χρωματογραφικής διάταξης με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (3.7.3) συγκέντρωσης 4,0 μg/ml έως ότου επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.6.2. Καμπύλη αναφοράς

Εισάγονται κατ' επανάληψη καθένα από τα διαλύματα αναφοράς (3.7.3) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών (εμβαδά) για κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς με τεταγμένες τις μέσες τιμές του ύψους των κορυφών ή τις μέσες τιμές των εμβαδών και με τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.6.3. Διάλυμα δείγματος

Εισάγεται κατ' επανάληψη στη στήλη το εκχύλισμα του δείγματος (5.5) σε όγκο ίσο με εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) των κορυφών που αντιστοιχούν στην ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του δείγματος σε μg/ml με βάση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της μεθυλ-μπενζοκουέιτ του διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.6.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ w (mg/kg) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

όπου:

c = η συγκέντρωση της μεθυλ-μπενζοκουέιτ στο διάλυμα του δείγματος, σε μg/ml και

m = το βάρος του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων

7.1. Ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας

Η ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή με τη χρήση συστοιχίας διόδων ως ανιχνευτή με τον οποίο γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (3.7.3) συγκέντρωσης 10 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα του δείγματος εμπλουτίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.7.2). Η ποσότητα της προστιθέμενης μεθυλ-μπενζοκουέιτ πρέπει να είναι παραπλήσια προς την κατ' εκτίμηση υπολογιζόμενη ποσότητα μεθυλ-μπενζοκουέιτ στο εκχύλισμα του δείγματος.

Αν συνεκτιμηθούν τόσο η ποσότητα που προστέθηκε όσο και η αραίωση του εκχυλίσματος, πρέπει να σημειωθεί ενίσχυση μόνον της κορυφής που αντιστοιχεί στην ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ περίπου του μεγίστου ύψους αυτής δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από 10 % περίπου σε σχέση με το αρχικό εύρος.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχία διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα του δείγματος και στο φάσμα του προτύπου και τα οποία αντιστοιχούν στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι τα ίδια, με μια διαφορά της οποίας τα όρια καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα της ανιχνευτικής διάταξης. Για ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό είναι ± 2 nm.

▼B

β) Μεταξύ 220 και 350 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα τμήματα εκείνα του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % απορρόφησης της πρότυπης ανιχνευόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 220 και 350 nm νανομέτρων, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα, στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν το ένα από το άλλο για τα τμήματα εκείνα του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος.

Εάν έστω και ένα από τα ανωτέρω κριτήρια δεν πληρούται, τότε η παρουσία της ανιχνευόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωθείσα.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων ποσοτικών προσδιορισμών επί του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του αποτελέσματος με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητα της μεθυλ-μπενζοκουΐτ μεταξύ 4 και 20 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Για ένα εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. Αποτελέσματα συλλογικής μελέτης

Αναλύθηκαν πέντε δείγματα σε δέκα εργαστήρια και κάθε δείγμα αναλύθηκε δύο φορές.

	Τυφλό	Άλευρο 1	Σύμπλεκτο 1	Άλευρο 2	Σύμπλεκτο 2
Μέσος όρος [mg/kg]	ΔΑ	4,50	4,50	8,90	8,70
s _r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV _r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s _R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Ανάκτηση [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ΔΑ = δεν ανιχνεύθηκε

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής μεταβολής της επαναληψιμότητας, %

s_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγιμότητας, %.

B. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΑΚΙΝΔΟΞΗΣ

2-[N-2'-(υδροξυαιθυλο)καρβαμυλο]- 3-μεθυλοκινολίνης -N¹,N⁴-διοξείδιο

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολακινδόξης (olaquinox) στις ζωοτροφές. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού είναι 5mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα νερού-μεθανόλης. Η περιεκτικότητα σε ολακινδόξη προσδιορίζεται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσης χρησιμοποιώντας ανιχνευτή UV.

▼B**3. Αντιδραστήρια****3.1. Μεθανόλη****3.2. Μεθανόλη, καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC****3.3. Νερό, καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC****3.4. Κινητή φάση για HPLC**

Μείγμα νερού (3.3)-μεθανόλης (3.2), 900 + 100 (V + V)

3.5. Πρότυπη ουσία: καθαρή ολακινδόξη [2'-(N-2'-(υδροξυαιθύλο)καρβαμυλο] - 3-μεθυλοκινόζαλίνης-N¹,N⁴- διοξείδιο, E 851**3.5.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα 250 µg/ml**

Σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1mg, 50 mg ολακινδόξης (3.5) και προστίθενται 190 ml περίπου νερό. Κατόπιν, η φιάλη τοποθετείται για 20 λεπτά σε λουτρό υπερήχων (4.1). Μετά το λουτρό, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και ανακινείται για να αναμειχθεί. Η φιάλη τυλίγεται με ένα φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται σε ψυγείο. Να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μήνα.

3.5.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα ολακινδόξης, 25 µg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml μεταφέρονται 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.5.1), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.4) και ανακινείται για να αναμειχθεί καλά. Η φιάλη τυλίγεται με ένα φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται σε ψυγείο. Να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μέρα.

3.5.3. Διαλύματα αναφοράς

Σε μία σειρά από ογκομετρικές φιάλες των 50 ml, μεταγγίζονται 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 και 20,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.5.2). Τα διαλύματα συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.4), ανακινούνται και στη συνέχεια οι φιάλες τυλίγονται με ένα φύλλο αλουμινίου. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 και 10,0 µg ολακινδόξης ανά ml.

Κάθε μέρα πρέπει να παρασκευάζονται φρέσκα διαλύματα.

4. Όργανα**4.1. Λουτρό υπερήχων****4.2. Μηχανικός αναδευτήρας****4.3. Εξοπλισμός για HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους μεταβλητού μήκους κύματος ή με ανιχνευτή διόδων****4.3.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, πληρωτικό υλικό C₁₈, 10 µm ή ισοδύναμη με αυτήν στήλη****4.4. Φίλτρα μεμβράνης 0,45 µm****5. Διαδικασία**

Σημείωση: Η ολακινδόξη παρουσιάζει ευαισθησία στο φως, γι' αυτό όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται με χαμηλό φωτισμό ή να χρησιμοποιούνται κτρινωπά γυάλινα σκεύη.

5.1. Γενικά**5.1.1. Καταρχάς, πρέπει να υποβάλλεται σε ανάλυση ένα τυφλό δείγμα για να επιβεβαιώνεται ότι αυτό είναι απαλλαγμένο από ολακινδόξη ή άλλες παρεμβαίνουσες προσμίξεις.****5.1.2. Πρέπει να εκτελείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση το τυφλό το οποίο εμπλουτίστηκε με ολακινδόξη, παρόμοια με εκείνη του δείγματος. Για να επιτευχθεί εμπλουτισμός της τάξης των 50 mg/kg, σε**

▼B

κωνική φιάλη των 250 ml μεταφέρονται 10,0 ml του αρχικού προτύπου διαλύματος (3.5.1) και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, η φιάλη ανακινείται επισταμένως και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά, ανακινώντας την και πάλι μερικές φορές πριν να προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, το τυφλό πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και να μην ανιχνεύεται σε αυτό ολακινδόζη.

5.2. Εκχύλιση

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,01 g περίπου 50 g του δείγματος. Η ποσότητα αυτή του δείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 1 000 ml, προστίθενται 100 ml μεθανόλης (3.1) και η φιάλη τοποθετείται για 5 λεπτά στο λουτρό υπερήχων (4.1). Προστίθενται 410 ml νερού και η φιάλη αφήνεται στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά ακόμη. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό υπερήχων, το περιεχόμενο αναταράσσεται για 30 λεπτά στον αναδευτήρα (4.2) και διηθείται με πτυχωτό ηθμό. Μεταφέρονται 10 ml του διηθήματος σε μια βαθμονομημένη φιάλη των 20 ml, συμπληρώνεται με νερό και αναμειγνύεται. Φιλτράρεται ένα κλάσμα μέσω φίλτρου μεμβράνης (4.4) (βλ. παρατήρηση στην παράγραφο 9). Συνεχίζεται ο προσδιορισμός στην HPLC (5.3).

5.3. Προσδιορισμός HPLC

5.3.1. Παράμετροι:

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού συνιστάται η χρήση των παρακάτω συνθηκών, χωρίς να αποκλείεται η χρήση και άλλων συνθηκών υπό την προϋπόθεση ότι λαμβάνονται ισοδύναμα αποτελέσματα.

Αναλυτική στήλη (4.3.1)

Κινητή φάση (3.4): μείγμα νερού (3.3) — μεθανόλης (3.2.), 900 + 100 (V + V)

Ρυθμός ροής: 1,5-2 ml/min

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 380 nm

Όγκος έγχυσης: 20 µl-100 µl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας επανειλημμένως το διάλυμα αναφοράς (3.5.3) που περιέχει 2,5 µg/ml, μέχρι να επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών και χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα αναφοράς (3.5.3) εγχύεται επανειλημμένως και προσδιορίζεται για κάθε συγκεντρώση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών. Η καμπύλη αναφοράς χαράσσεται θέτοντας τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων αναφοράς στον άξονα των τεταγμένων και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε µg/ml στον άξονα των τετμημένων.

5.3.3. Δείγμα υπό μορφή διαλύματος

Χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο που χρησιμοποιείται και στην περίπτωση των διαλυμάτων αναφοράς, το δείγμα-διάλυμα (5.2) εγχύεται επανειλημμένως και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της ολακινδόξης.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα σε ολακινδόξη του υπό μορφή διαλύματος δείγματος προσδιορίζεται σε µg/ml από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της ολακινδόξης του εν λόγω δείγματος, με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).

Η περιεκτικότητα w του δείγματος σε ολακινδόξη σε mg/kg υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

▼B

όπου:

c = η συγκέντρωση της ολακινδόξης στο δείγμα διάλυμα (5.2) σε $\mu\text{g/ml}$

m = το βάρος του δείγματος δοκιμής σε g (5.2)

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων

7.1. Ταυτότητα

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή χρησιμοποιώντας ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του διαλύματος του δείγματος (5.2) και του διαλύματος αναφοράς (3.5.3) που περιέχει 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Δείγμα-διάλυμα (5.2) εμπλουτίζεται προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αναφοράς (3.5.3). Η ποσότητα της προστιθέμενης ολακινδόξης πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα της ολακινδόξης που υπάρχει στο δείγμα (5.2).

Πρέπει να εμφανίζεται ενίσχυση μόνο της κορυφής που αντιστοιχεί στην ολακινδόξη ανάλογα τόσο με την προστεθείσα ποσότητα όσο και με την αραιώση του διαλύματος. Το εύρος της κορυφής, στο ήμισυ του ύψους της, πρέπει να κυμαίνεται στο $\pm 10 \%$ του αρχικού εύρους της κορυφής της ολακινδόξης του μη εμπλουτισμένου δείγματος.

7.1.2. Ανίχνευση με ανιχνευτή διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης του δείγματος και των πρότυπων φασμάτων, που αντιστοιχεί στο ανώτατο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι το ίδιο και να κυμαίνεται σε όρια που καθορίζονται από την αναλυτική ισχύ του συστήματος ανίχνευσης. Για ανίχνευση με διόδους, τα όρια αυτά είναι συνήθως $\pm 2 \text{ nm}$
- β) μεταξύ 200 και 400 nm, το δείγμα και τα πρότυπα φάσματα που αντιστοιχούν στο ανώτατο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα μέρη εκείνα του φάσματος που εμπίπτουν στην περιοχή του 10-100 % σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό θεωρείται ότι πληρούται όταν τα εμφανιζόμενα μέγιστα είναι τα ίδια και σε κανένα από τα παρατηρούμενα σημεία η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας
- γ) μεταξύ 220 και 400 nm, τα φάσματα της ανωφέρειας, του ανώτατου σημείου και της κατωφέρειας της κορυφής που δίνει το δείγμα-διάλυμα δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα σημεία εκείνα του φάσματος που εμπίπτουν στην περιοχή του 10-100 % σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό θεωρείται ότι πληρούται όταν τα εμφανιζόμενα μέγιστα είναι τα ίδια και όταν σε όλα τα παρατηρούμενα σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του ανώτατου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα οποιοδήποτε από τα παραπάνω κριτήρια δεν πληρούνται, τότε δεν μπορεί θεωρηθεί ότι βεβαιώθηκε η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για συγκεντρώσεις ολακινδόξης μεταξύ 10 και 200 mg/kg .

7.3. Ανάκτηση

Σε ένα εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

▼ B

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Κοινοότητας στην οποία 4 δείγματα χοιροτροφής, συμπεριλαμβανομένου και ενός τυφλού, αναλύθηκαν σε 13 εργαστήρια. Τα αποτελέσματα δίδονται κατωτέρω:

	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Μέσος όρος [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	—	15	50	100
Ανάκτηση %	—	97,3	96,0	95,4

L = αριθμός εργαστηρίων
n = αριθμός μεμονωμένων τιμών
S_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας
CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

9. Παρατήρηση

Αν και η μέθοδος δεν έχει αξιολογηθεί για τροφές που περιέχουν περισσότερο από 100 mg/kg ολακινδόξης, είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα παίρνοντας μικρότερη ποσότητα δείγματος ή/και αραιώνοντας το εκχύλισμα (5.2) ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις μέσα στα όρια της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΜΠΡΟΛΙΟΥ

Υδροχλωρικό άλας του χλωριούχου 1-[(4-αμινο-2-προπυλοπυριμιδιν-5-υλο)μεθυλο]- 2-μεθυλο-πυριδινίου

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του αμπρολίου σε ζωοτροφές και προμείγματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 5 mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα μεθανόλης-νερού. Έπειτα από αραίωση με την κινητή φάση και διήθηση μέσω φίλτρου μεμβράνης, η περιεκτικότητα σε αμπρόλιο προσδιορίζεται με κατιοανταλλακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρήση ανιχνευτή υπεριώδους.

3. Αντιδραστήρια

3.1. Μεθανόλη

3.2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.3. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.4. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου, c = 0,1 mol/l

13,80 g μονοένυδρου δισόξινου φωσφορικού νατρίου διαλύονται σε νερό (3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό (3.3) μέχρι τη χαραγή και ανακινείται.

3.5. Διάλυμα υπερχλωρικού νατρίου, c = 1,6 mol/l

224,74 g μονοένυδρου υπερχλωρικού νατρίου διαλύονται σε νερό (3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (3.3) και ανακινείται.

▼B

- 3.6. Κινητή φάση για την HPLC (βλ. παρατήρηση στην παράγραφο 9.1)

Μείγμα ακετονιτρίλιου (3.2), διαλύματος δισόξινου φωσφορικού νατρίου (3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (3.5), 450 + 450 + 100 (v+v+v). Πριν από τη χρήση, διηθείται διαμέσου διηθητικής μεμβράνης πάχους 0,22 μm (4.3) και το διάλυμα απαεριώνεται [π.χ. σε λουτρό υπερήχων (4.4) για 15 λεπτά τουλάχιστον].

- 3.7. Πρότυπη ουσία: καθαρό αμπρόλιο, υδροχλωρικό άλας χλωριούχου 1-[(4-αμινο-2-προπυλοπυριμιδιν-5-υλο)μεθυλο]-2-μεθυλο-πυριδινίου, E 750 (βλ. παράγραφο 9.2)

- 3.7.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg αμπρολίου (3.7), διαλύονται σε 80 ml μεθανόλης (3.1) και η φιάλη τοποθετείται για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων (4.4). Στη συνέχεια, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και ανακινείται. Σε θερμοκρασία $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

- 3.7.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 50 μg/ml

5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) παραλαμβάνονται με σιφόνιο και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον διαλύτη εκχύλισης (3.8) και ανακινείται. Σε θερμοκρασία $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ το διάλυμα είναι σταθερό για ένα μήνα.

- 3.7.3. Διαλύματα βαθμονόμησης

0,5, 1,0 και 2,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.7.2) μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.6) και ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,5, 1,0 και 2,0 μg αμπρολίου ανά ml αντιστοίχως. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να ετοιμάζονται λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν.

- 3.8. Διαλύτης εκχύλισης

Μείγμα μεθανόλης (3.1)-νερού 2+1 (v+v)

4. Όργανα

- 4.1. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης, κατάλληλο για έγχυση όγκων 100 μl

- 4.1.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας 125 mm × 4 mm, κατιοανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη

- 4.1.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων

- 4.2. Φίλτρο μεμβράνης υλικό PTFE, 0,45 μm

- 4.3. Φίλτρο μεμβράνης 0,22 μm

- 4.4. Λουτρό υπερήχων

- 4.5. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας

5. Διαδικασία

- 5.1. Γενικά

- 5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2), πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε αμπρόλιο ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό αμπρόλιο ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

▼B

5.1.2 Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας αμπρολίου, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλ. παράγραφο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα αμπρολίου παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση

5.2.1. Προμείγματα (περιεκτικότητα < 1 % σε αμπρόλιο) και ζωοτροφές

Σε κωνική φιάλη των 500 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g, 5-40 g του δείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχύλισης (3.8). Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 µg/ml και αναμειγνύεται (9.3). 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται μέσω μεμβράνης (4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.2.2. Προμείγματα (περιεκτικότητα ≥ 1 % σε αμπρόλιο)

Σε κωνική φιάλη των 500 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, 1-4 g του προμείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχύλισης (3.8). Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 µg/ml και αναμειγνύεται. 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται μέσω μεμβράνης (4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.3).

5.3. Προσδιορισμός με HPLC

5.3.1. Προσδιορισμός με HPLC

Παρακάτω δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Υγρή χρωματογραφική

στήλη (4.1.1):	125 mm × 4 mm, κατιονανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 5 ή 10 µm ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (3.6):	Μείγμα ακετονιτριλίου (3.2), διαλύματος δισόξινου φωσφορικού νατρίου (3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (3.5) 450+450+100 (v+v+v).
Ρυθμός ροής:	0,7-1 ml/min
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	264 nm
Όγκος έγχυσης:	100 µl

▼B

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα βαθμονόμησης (3.7.3) που περιέχει 1,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα βαθμονόμησης ή αναφοράς (3.7.3) εγχύεται κατ' επανάληψη και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής κάθε συγκέντρωσης. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχύεται κατ' επανάληψη το εκχύλισμα του δείγματος (5.2) χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων βαθμονόμησης και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων

Από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml βάσει της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).

Η συγκέντρωση κατά βάρος σε mg/kg του αμπρολίου στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

όπου:

V = όγκος του διαλύτη εκχύλισης (3.8) σε ml σύμφωνα με το 5.2 (δηλαδή 200 ml)

c = συγκέντρωση αμπρολίου στο εκχύλισμα δείγματος (5.2) σε μg/ml

f = συντελεστής αραίωσης σύμφωνα με το 5.2

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g.

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων

7.1. Ταυτότητα

Η ταυτότητα της αναλύμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (5.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (3.7.3) που περιέχει 2,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (5.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (3.7.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου αμπρολίου πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του αμπρολίου που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του αμπρολίου πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 10 \%$ του αρχικού πλάτους της κορυφής του αμπρολίου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη διόδων είναι συνήθως $\pm 2 \text{ nm}$.

▼B

β) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλύομενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλύομενης ουσίας.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει

- το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο από 25 mg/kg έως 500 mg/kg,
- τα 75 mg/kg για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο μεταξύ 500 mg/kg και 1 000 mg/kg,
- το 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο άνω των 1 000 mg/kg.

7.3. Ανάκτηση

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν τρεις πτηνοτροφές (δείγμα 1-3), μια ανόργανη (δείγμα 4) και ένα πρό-μειγμα (δείγμα 5). Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα

	Δείγμα 1 (τυφλό)	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Μέσος όρος [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας

s_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

▼ B

9. Παρατηρήσεις

- 9.1. Εάν το δείγμα περιέχει θειαμίνη, η κορυφή της θειαμίνης στο χρωματογράφημα εμφανίζεται λίγο πριν από την κορυφή του αμπρόλιου. Σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο, το αμπρόλιο και η θειαμίνη πρέπει να διαχωρίζονται. Εάν το αμπρόλιο και η θειαμίνη δεν διαχωρίζονται από τη στήλη (4.1.1) που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο, ένα μέρος του ακετονιτρίλιου της κινητής φάσης (3.6) μέχρι 50 % πρέπει να αντικαθίσταται από μεθανόλη.
- 9.2. Σύμφωνα με τη Βρετανική Φαρμακοποιία, το φάσμα διαλύματος αμπρόλιου ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) σε υδροχλωρικό οξύ ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) εμφανίζει μέγιστα στα 246 nm και 262 nm. Η απορρόφηση ανέρχεται σε 0,84 στα 246 nm και 0,80 στα 262 nm.
- 9.3. Το εκχύλισμα πρέπει να αραιώνεται πάντοτε με την κινητή φάση διότι διαφορετικά ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής του αμπρόλιου μπορεί να μετατοπιστεί σημαντικά λόγω μεταβολών της ιονικής ισχύος.

Δ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΒΑΔΟΞΗΣ

Μέθοδο 3-(2-κινόξαλινυλομεθυλενο)καρβαζικό N^1, N^4 -διοξείδιο

1. Σκοπός και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της καρβαδόξης σε ζωοτροφές, προμείγματα και παρασκευάσματα. Το όριο ανίχνευσης είναι 1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 5 mg/kg.

2. Αρχή

Το δείγμα αναμειγνύεται με νερό και εκχυλίζεται με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο. Στις ζωοτροφές, κατάλληλη ποσότητα του διηθημένου εκχυλίσματος υποβάλλεται σε καθαρισμό σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Στα προμείγματα και παρασκευάσματα, ποσότητα του διηθημένου εκχυλίσματος αραιώνεται σε κατάλληλη συγκέντρωση με νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. Η περιεκτικότητα της καρβαδόξης προσδιορίζεται με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσης με χρήση ανιχνευτή UV.

3. Αντιδραστήρια

- 3.1. Μεθανόλη
- 3.2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC
- 3.3. Οξικό οξύ, $w = 100 \%$
- 3.4. Οξείδιο αργιλίου: ουδέτερο, βαθμός δραστηριότητας I
- 3.5. Μεθανόλη-ακετονιτρίλιο 1 + 1 (v + v)
- 500 ml μεθανόλης (3.1) αναμειγνύονται με 500 ml ακετονιτρίλιου (3.2).
- 3.6. Οξικό οξύ, $\sigma = 10 \%$
- 10 ml οξικού οξέος (3.3) αραιώνονται μέχρι τα 100 ml με νερό.
- 3.7. Οξικό νάτριο
- 3.8. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC
- 3.9. Οξικό ρυθμιστικό διάλυμα, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$

0,82 g οξικού νατρίου (3.7) διαλύονται σε 700 ml νερό (3.8) και ρυθμίζεται το pH στο 6,0 με οξικό οξύ (3.6). Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (3.8) και αναμειγνύεται.

3.10. Κινητή φάση για HPLC

825 ml οξικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.9) αναμειγνύονται με 175 ml ακετονιτρίλιου (3.2).

Ακολουθεί διήθηση μέσω φίλτρου 0,22 μm (4.5) και απαερίωση του διαλύματος (π.χ. με υπερήχους για 10 λεπτά).

▼B

3.11. Πρότυπη ουσία

Καθαρή καρβαδόξη: Μεθυλο 3-(2-κινολυνομεθυλενο)καρβαζικό N1,N4-διοξείδιο, E 850

3.11.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα καρβαδόξης, 100 µg/ml (βλ. παράγραφο 5, Διαδικασία):

Σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg πρότυπης ουσίας καρβαδόξης (3.11). Διαλύονται σε μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) με εφαρμογή υπερήχων (4.7). Μετά τους υπερήχους, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Το διάλυμα αυτό είναι σταθερό για ένα μήνα σε θερμοκρασία $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.11.2. Διαλύματα βαθμονόμησης

2,0, 5,0, 10,0, και 20,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.11.1) μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 100 ml. Προστίθενται 30 ml νερό, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) και αναμειγνύονται. Οι φιάλες περιτυλίσσονται με φύλλο αλουμινίου. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 2,0, 5,0, 10,0 και 20,0 µg/ml καρβαδόξης αντίστοιχα.

Τα διαλύματα βαθμονόμησης πρέπει να ετοιμάζονται λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν.

Σημείωση: Για τον προσδιορισμό καρβαδόξης σε ζωοτροφές που περιέχουν λιγότερο από 10 mg/kg, πρέπει να παρασκευάζονται διαλύματα βαθμονόμησης με συγκέντρωση κάτω 2,0 µg/ml.

3.12. Μείγμα νερού-[μεθανόλης-ακετονιτρίλιου] (3.5), 300 + 700 (v + v)

300 ml νερό αναμειγνύονται με 700 ml του μείγματος μεθανόλης-ακετονιτρίλιου (3.5).

4. Όργανα

4.1. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας

4.2. Ηθμός υαλοϊνών (Whatman GF/A ή ισοδύναμος)

4.3. Γυάλινη στήλη (μήκος 300 έως 400 mm, εσωτερική διάμετρος περίπου 10 mm) με εσφυρισμένη απόληξη σύνδεσης και βαλβίδα εξαγωγής.

Σημείωση: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και γυάλινη στήλη εφοδιασμένη με στρόφιγγα ή γυάλινη στήλη που στενεύει στο άκρο της. Στην περίπτωση αυτή, στο κάτω άκρο εισάγεται μικρή ποσότητα υαλοβάμβακα και πιέζεται προς τα κάτω με μια γυάλινη ράβδο.

4.4. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης, κατάλληλο για έγχυση όγκων 20 µl

4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας: 300 mm × 4 mm, C₁₈, 10 µm ή ισοδύναμη.

4.4.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων κατάλληλος για περιοχή μηκών κύματος 225 έως 400 nm.

4.5. Φίλτρο μεμβράνης 0,22 µm.

4.6. Φίλτρο μεμβράνης 0,45 µm.

4.7. Λουτρό υπερήχων.

▼B**5. Διαδικασία**

Σημείωση: Η καρβαδόξη είναι ευαίσθητη στο φως. Όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται σε ημίφως ή να χρησιμοποιούνται υάλινα σκεύη σκουρόχρωμα ή τυλιγμένα με φύλλο αλουμινίου.

5.1. Γενικά**5.1.1. Τυφλό**

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (5.1.2), πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε καρβαδόξη ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό καρβαδόξη ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα (5.1.1) εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας καρβαδόξης, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό 50 mg/kg, 5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.11.1) μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 200 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι όγκου περίπου 0,5 ml σε ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 10 g του τυφλού, αναμειγνύονται και περιμένουμε για 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλ. παράγραφο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα καρβαδόξης παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. Εκχύλιση**5.2.1. Ζωοτροφές**

Ζυγίζονται με προσέγγιση 0,01 g, 10 g του δείγματος και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 200 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 35,0 ml μεθανόλης-ακετονιτρίλιου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται για 30 λεπτά σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα. Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2). Το εν λόγω διάλυμα κρατείται για το στάδιο καθαρισμού (5.3).

5.2.2. Προμείγματα (0,1-2,0 %)

Ζυγίζεται με ακρίβεια 0,001 g, 1 g του μη αλεσμένου δείγματος και μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 200 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 35,0 ml μεθανόλης-ακετονιτρίλιου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται για 30 λεπτά σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (4.1). Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2).

Κατάλληλη ποσότητα διηθήματος μεταφέρεται με σιφόνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 15,0 ml νερό, συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (3.5) και αναμειγνύονται. Η συγκέντρωση της καρβαδόξης στο τελικό διάλυμα πρέπει να είναι περίπου 10 µg/ml. Κατάλληλη ποσότητα διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 µm (4.6).

Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.2.3. Παρασκευάσματα (> 2 %)

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, 0,2 g του μη αλεσμένου δείγματος και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Προστίθενται 45,0 ml νερό, αναμειγνύονται και αφήνονται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Προστίθενται 105,0 ml μεθανόλης-ακετονιτρίλιου (3.5), η φιάλη πωματίζεται και το

▼B

περιεχόμενο ομοιογενοποιείται. Το δείγμα υποβάλλεται για 15 λεπτά σε επεξεργασία με υπερήχους (4.7) και ακολουθεί ανακίνηση ή ανάδευση για 15 λεπτά (4.1). Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών (4.2).

Κατάλληλη ποσότητα του διηθήματος αραιώνεται με μείγμα νερού-μεθανόλης ακετονιτριλίου (3.12) μέχρι τελικής συγκέντρωσης καρβαδόξης 10-15 µg/ml (για παρασκεύασμα 10 %, ο συντελεστής αραιώσης είναι 10). Κατάλληλη ποσότητα διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 µm (4.6).

Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.3. Καθαρισμός

5.3.1. Ετοιµασία της στήλης οξειδίου του αργιλίου

Ζυγίζονται 4 g οξειδίου του αργιλίου (3.4) και μεταφέρονται στη γυάλινη στήλη (4.3).

5.3.2. Καθαρισμός δείγματος

15 ml του διηθημένου εκχυλίσματος (5.2.1) μεταγγίζονται στη στήλη του οξειδίου του αργιλίου και τα πρώτα 2 ml του εκλούσματος απορρίπτονται. Τα επόμενα 5 ml συλλέγονται και κατάλληλη ποσότητα διηθείται διαμέσου φίλτρου 0,45 µm (4.6).

Ακολουθεί ο προσδιορισμός με HPLC (5.4).

5.4. Προσδιορισμός με HPLC

5.4.1. Παράµετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναµα αποτελέσματα:

Υγρή χρωματογραφική στήλη (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C ₁₈ , 10 µm πλήρωση ή ισοδύναµη
Κινητή φάση (3.10):	Μείγμα οξικού ρυθμιστικού διαλύματος (3.9) και ακετονιτριλίου (3.2), 825 + 175 (v+v)
Ρυθμός ροής:	1,5-2 ml/min
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	365 nm
Όγκος έγχυσης:	20 µl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα βαθμονόμησης (3.11.2) που περιέχει 5,0 µg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Καµπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα βαθμονόμησης (3.11.2) εγχύεται κατ' επανάληψη και μετρώνται τα ύψη (εμβαδά) των κορυφών για κάθε συγκέντρωση. Χαραρσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγµένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τετμηµένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε µg/ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχύεται κατ' επανάληψη το εκχύλισμα δείγματος [(5.3.2) για ζωοτροφές, (5.2.2) για προµείγµατα και (5.2.3) για παρασκευάσµατα] και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της καρβαδόξης.

▼B**6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Από το μέσο ύψος (εμβადόν) των κορυφών της καρβαδόξης του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα καρβαδόξης στο διάλυμα του δείγματος σε $\mu\text{g/ml}$ βάσει της καμπύλης αναφοράς (5.4.2).

6.1. Ζωοτροφές

Η περιεκτικότητα κατά βάρος (mg/kg) της καρβαδόξης στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

όπου:

c = συγκέντρωση της καρβαδόξης στο εκχύλισμα δείγματος (5.3.2.) σε $\mu\text{g/ml}$,

V_1 = όγκος εκχύλισης ml (δηλαδή 50),

m = βάρος της προς δοκιμή ποσότητας σε g .

6.2. Προμείγματα και παρασκευάσματα

Η περιεκτικότητα κατά βάρος (mg/kg) της καρβαδόξης στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = συγκέντρωση της καρβαδόξης στο εκχύλισμα δείγματος (5.2.2. ή 5.2.3.) σε $\mu\text{g/ml}$,

V_2 = όγκος εκχύλισης σε ml (δηλαδή 50 για προμείγματα, 150 για παρασκευάσματα),

f = συντελεστής αραίωσης σύμφωνα με το 5.2.2 (προμείγματα) ή 5.2.3. (παρασκευάσματα),

m = βάρος της προς δοκιμή ποσότητας σε g .

7. Επικύρωση των αποτελεσμάτων**7.1. Ταυτότητα**

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή δίοδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος δείγματος και του διαλύματος βαθμονόμησης (3.11.2) που περιέχει $10,0 \mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (3.11.2). Η ποσότητα της προστιθέμενης καρβαδόξης πρέπει να είναι παρόμοια με την εκτιμώμενη ποσότητα καρβαδόξης στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής της καρβαδόξης πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να παρεκκλίνει περισσότερο από 10 % του αρχικού πλάτους.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη δίοδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη δίοδων είναι συνήθως $+ 2 \text{ nm}$.

▼B

- β) Μεταξύ 225 και 400 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας·
- γ) Μεταξύ 225 και 400 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. Επαναληψιμότητα

Για περιεκτικότητες 10 mg/kg και άνω, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή.

7.3. Ανάκτηση

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν 6 ζωοτροφές, 4 προμείγματα και 3 παρασκευάσματα από 8 εργαστήρια. Σε κάθε δείγμα έγιναν δύο αναλύσεις (Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη διεργαστηριακή μελέτη, βλ. *The Journal of AOAC*, τόμος 71, 1988, σ. 484-490). Τα αποτελέσματα (με εξαίρεση τα εκτός ορίων εκτρεπόμενα) εμφανίζονται κατωτέρω:

Πίνακας 1

Αποτελέσματα της διεργαστηριακής μελέτης για ζωοτροφές

	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Μέσος όρος (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S _r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV _r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S _R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV _R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Ονομαστική περιεκτικότητα (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Πίνακας 2

Αποτελέσματα της διεργαστηριακής μελέτης για προμείγματα και παρασκευάσματα

	Προμείγματα				Παρασκευάσματα		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Μέσος όρος (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S _R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Προμείγματα				Παρασκευάσματα		
	A	B	C	D	A	B	C
CV _R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Ονομαστική περιεκτικότητα (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

S_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας

S_R = απόκλιση αναπαραγωγικότητας

CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγικότητας.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑΣ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΑΡΘΡΟ 6

1. Οδηγία 71/250/ΕΟΚ

Οδηγία 71/250/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1 πρώτο εδάφιο	Άρθρο 3
Άρθρο 1 δεύτερο εδάφιο	Άρθρο 2
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα, μέρος 1	Παράρτημα II
Παράρτημα, μέρος 2	—
Παράρτημα, μέρος 3	—
Παράρτημα, μέρος 4	Παράρτημα III, μέρος ΙΕ
Παράρτημα, μέρος 5	Παράρτημα III, μέρος ΙΓ
Παράρτημα, μέρος 6	Παράρτημα III, μέρος ΙΔ
Παράρτημα, μέρος 7	Παράρτημα III, μέρος ΙΖ
Παράρτημα, μέρος 9	Παράρτημα III, μέρος ΙΑ
Παράρτημα, μέρος 10	—
Παράρτημα, μέρος 11	—
Παράρτημα, μέρος 12	Παράρτημα III, μέρος Ι
Παράρτημα, μέρος 14	Παράρτημα III, μέρος Δ
Παράρτημα, μέρος 16	—

2. Οδηγία 71/393/ΕΟΚ

Οδηγία 71/393/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα, μέρος Ι	Παράρτημα III, μέρος Α
Παράρτημα, μέρος ΙΙ	Παράρτημα III, μέρος Ε
Παράρτημα, μέρος ΙΙΙ	Παράρτημα III, μέρος ΙΣΤ
Παράρτημα, μέρος ΙV	Παράρτημα III, μέρος Η

3. Οδηγία 72/199/ΕΟΚ

Οδηγία 72/199/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Παράρτημα Ι, μέρος 1	Παράρτημα III, μέρος ΙΒ
Παράρτημα Ι, μέρος 2	Παράρτημα III, μέρος Γ
Παράρτημα Ι, μέρος 3	—
Παράρτημα Ι, μέρος 4	—
Παράρτημα Ι, μέρος 5	Παράρτημα V, μέρος Α
Παράρτημα ΙΙ	—

4. Οδηγία 73/46/ΕΟΚ

Οδηγία 73/46/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Παράρτημα Ι, μέρος 1	Παράρτημα III, μέρος Β
Παράρτημα Ι, μέρος 2	—
Παράρτημα Ι, μέρος 3	Παράρτημα III, μέρος Θ

▼B**5. Οδηγία 76/371/ΕΟΚ**

Οδηγία 76/371/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 1
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	Παράρτημα Ι

6. Οδηγία 76/372/ΕΟΚ

Οδηγία 76/372/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	—
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	—

7. Οδηγία 78/633/ΕΟΚ

Οδηγία 78/633/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα, μέρος 1	—
Παράρτημα, μέρος 2	—
Παράρτημα, μέρος 3	Παράρτημα IV, μέρος Γ

8. Οδηγία 81/715/ΕΟΚ

Οδηγία 81/715/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	—
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	—

9. Οδηγία 84/425/ΕΟΚ

Οδηγία 84/425/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	—
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	—

10. Οδηγία 86/174/ΕΟΚ

Οδηγία 86/174/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 4
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	Παράρτημα VII

11. Οδηγία 93/70/ΕΟΚ

Οδηγία 93/70/ΕΟΚ	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα	Παράρτημα IV, μέρος Δ

▼B**12. Οδηγία 93/117/EK**

Οδηγία 93/117/EK	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρα 3 και 5
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Παράρτημα, μέρος 1	Παράρτημα IV, μέρος E
Παράρτημα, μέρος 2	Παράρτημα VIII, μέρος A

13. Οδηγία 98/64/EK

Οδηγία 98/64/EK	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρα 3 και 5
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Παράρτημα, μέρος A	Παράρτημα III, μέρος ΣΤ
Παράρτημα, μέρος Γ	Παράρτημα VIII, μέρος B

14. Οδηγία 1999/27/EK

Οδηγία 1999/27/EK	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρα 3 και 5
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Άρθρο 5	—
Άρθρο 6	—
Άρθρο 7	—
Παράρτημα, μέρος A	Παράρτημα VIII, μέρος Γ
Παράρτημα, μέρος B	Παράρτημα IV, μέρος ΣΤ
Παράρτημα, μέρος Γ	Παράρτημα VIII, μέρος Δ

15. Οδηγία 1999/76/EK

Οδηγία 1999/76/EK	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Παράρτημα	Παράρτημα IV, μέρος Z

16. Οδηγία 2000/45/EK

Οδηγία 2000/45/EK	Παρόν κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Παράρτημα, μέρος A	Παράρτημα IV, μέρος A
Παράρτημα, μέρος B	Παράρτημα IV, μέρος B
Παράρτημα, μέρος Γ	Παράρτημα III, μέρος Z

▼B**17. Οδηγία 2002/70/EK**

Οδηγία 2002/70/EK	Παρών κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 1
Άρθρο 2	Άρθρα 2 και 3
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Άρθρο 5	—
Παράρτημα I	Παράρτημα I και παράρτημα V μέρος B (I)
Παράρτημα II	Παράρτημα II και παράρτημα V μέρος B (II)

18. Οδηγία 2003/126/EK

Οδηγία 2003/126/EK	Παρών κανονισμός
Άρθρο 1	Άρθρο 3
Άρθρο 2	—
Άρθρο 3	—
Άρθρο 4	—
Άρθρο 5	—
Άρθρο 6	—
Παράρτημα	Παράρτημα VI