

Acest document are doar scop informativ și nu produce efecte juridice. Instituțiile Uniunii nu își asumă răspunderea pentru conținutul său. Versiunile autentice ale actelor relevante, inclusiv preambulul acestora, sunt cele publicate în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene și disponibile pe site-ul EUR-Lex. Aceste texte oficiale pot fi consultate accesând linkurile integrate în prezentul document.

**► B**                                 **REGULAMENTUL (CE) NR. 152/2009 AL COMISIEI**  
**din 27 ianuarie 2009**  
**de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor**  
**(Text cu relevanță pentru SEE)**  
**(JO L 54, 26.2.2009, p. 1)**

Astfel cum a fost modificat prin:

		Jurnalul Oficial		
		NR.	Pagina	Data
► <b><u>M1</u></b>	Regulamentul (UE) nr. 278/2012 al Comisiei din 28 martie 2012	L 91	8	29.3.2012
► <b><u>M2</u></b>	Regulamentul (UE) nr. 51/2013 al Comisiei din 16 ianuarie 2013	L 20	33	23.1.2013
► <b><u>M3</u></b>	Regulamentul (UE) nr. 691/2013 al Comisiei din 19 iulie 2013	L 197	1	20.7.2013
► <b><u>M4</u></b>	Regulamentul (UE) nr. 709/2014 al Comisiei din 20 iunie 2014	L 188	1	27.6.2014
► <b><u>M5</u></b>	Regulamentul (UE) 2017/645 al Comisiei din 5 aprilie 2017	L 92	35	6.4.2017
► <b><u>M6</u></b>	Regulamentul (UE) 2017/771 al Comisiei din 3 mai 2017	L 115	22	4.5.2017
► <b><u>M7</u></b>	Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2020/1560 al Comisiei din 26 octombrie 2020	L 357	17	27.10.2020

**▼B****REGULAMENTUL (CE) NR. 152/2009 AL COMISIEI****din 27 ianuarie 2009****de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor****(Text cu relevanță pentru SEE)****▼M3***Articolul 1*

Eșantionarea pentru controlul oficial al furajelor, în special în ceea ce privește determinarea constituenților, inclusiv materialele care conțin, constau în sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), aditivii pentru hrana animalelor, astfel cum sunt definiți în Regulamentul (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului <sup>(1)</sup>, substanțele nedorite, astfel cum sunt definite de Directiva 2002/32/CE a Parlamentului European și a Consiliului <sup>(2)</sup>, se efectuează în conformitate cu metodele prevăzute în anexa I.

Metoda de eșantionare stabilită în anexa I se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide, astfel cum sunt definite în Regulamentul (CE) nr. 396/2005 al Parlamentului European și al Consiliului <sup>(3)</sup> și controlul privind conformitatea cu Regulamentul (UE) nr. 619/2011.

**▼B***Articolul 2*

Prepararea eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor se efectuează în conformitate cu metodele descrise în anexa II.

*Articolul 3*

Analizele pentru controlul oficial al furajelor se efectuează utilizând metodele descrise în anexa III (Metode de analiză pentru controlul compoziției materiilor prime furajere și a furajelor combinate), anexa IV (Metode de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje), anexa V (Metode de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje) și anexa VI (Metode de analiză pentru determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor).

*Articolul 4*

Valoarea energetică a furajelor combinate pentru păsări de crescătorie se calculează în conformitate cu anexa VII.

*Articolul 5*

Metodele de analiză pentru controlul prezenței ilegale a aditivilor care nu mai sunt autorizați pentru furaje, descrise în anexa VIII, se utilizează în scop de confirmare.

<sup>(1)</sup> JO L 268, 18.10.2003, p. 29.

<sup>(2)</sup> JO L 140, 30.5.2002, p. 10.

<sup>(3)</sup> JO L 70, 16.3.2005, p. 1.



#### *Articolul 6*

Directivile 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE, 81/715/CEE, 84/425/CEE, 86/174/CEE, 93/70/CEE, 93/117/CE, 98/64/CE, 1999/27/CE, 1999/76/CE, 2000/45/CE, 2002/70/CE și 2003/126/CE se abrogă.

Trimiterile la directivele abrogate se interpretează ca trimiteri la prezentul regulament și se citesc în conformitate cu tabelul de corespondență din anexa IX.

#### *Articolul 7*

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Se aplică de la 26 august 2009.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

▼ **M3***ANEXA I***METODE DE EȘANTIONARE****1. SCOPUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE**

Eșantioanele destinate controlului oficial al furajelor se prelevează în conformitate cu metodele descrise în continuare. Eșantioanele astfel prelevate se consideră reprezentative pentru loturile eșantionate.

Scopul eșantionării reprezentative este de a obține o mică fracțiune dintr-un lot în așa fel încât determinarea oricărei caracteristici speciale a acestei fracțiuni va reprezenta valoarea medie a caracteristicii lotului. Lotul se eșantionează prin prelevarea în mod repetat de eșantioane elementare, la diferite poziții unice din lot. Aceste eșantioane elementare sunt combinate prin amestecare pentru a forma un eșantion agregat pornind de la care sunt pregătite eșantioane finale reprezentative prin divizare reprezentativă.

În cazul în care, printr-o inspecție vizuală, porțiuni din furajele care urmează să fie eșantionate arată o diferență de calitate față de restul furajelor din același lot, aceste fragmente se separă de restul de furaje și se tratează ca subplot separat. În cazul în care nu este posibilă separarea furajului în subploturi separate, el se eșantionează ca un singur lot. În astfel de cazuri, se menționează acest fapt în raportul de eșantionare.

În cazul în care un furaj eșantionat în conformitate cu dispozițiile prezentului regulament este identificat ca neîndeplinind cerințele UE și face parte dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

**2. DEFINIȚII**

- Lot: o cantitate identificabilă de furaj având anumite caracteristici comune confirmate, precum originea, varietatea, tipul ambalajului, ambalatorul, expeditorul sau etichetarea și, în cazul unui proces de producție, o unitate de producție provenind dintr-o singură instalație care utilizează parametri de producție uniformi sau mai multe astfel de unități, dacă sunt produse în mod continuu și depozitate împreună.
- Lot eșantionat: un lot sau o parte identificată din lot sau subplot.
- Eșantion sigilat: un eșantion sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul.
- Eșantion elementar: o cantitate prelevată dintr-un punct al lotului eșantionat.
- Eșantion agregat: o combinație de eșantioane elementare prelevate din același lot eșantionat.
- Eșantion redus: o parte dintr-un eșantion agregat, obținută din acesta printr-un proces de reducere reprezentativă.
- Eșantion final: o parte din eșantionul redus sau din eșantionul agregat omogenizat.
- Eșantion de laborator: un eșantion destinat laboratorului (astfel cum este primit de laborator) și care poate fi eșantionul final, redus sau agregat.

**▼ M3****3. DISPOZIȚII GENERALE**

- Personalul însărcinat cu eșantionarea: eșantioanele se prelevează de către personal autorizat în acest sens de către autoritatea competentă.
  
- Eșantionul trebuie să fie sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul. Marcajul sigiliului ar trebui să poată fi identificat în mod clar și vizibil. În mod alternativ, eșantionul poate fi pus într-un recipient care poate fi închis astfel încât să nu poată fi deschis fără a deteriora în mod ireversibil recipientul, evitând reutilizarea recipientului.
  
- Identificarea eșantionului: eșantionul trebuie să poarte un marcaj de neșters și trebuie să fie identificat astfel încât să existe o legătură lipsită de ambiguitate cu raportul de eșantionare.
  
- Din fiecare eșantion agregat sunt prelevate cel puțin două eșantioane finale: cel puțin unul pentru control (asigurarea respectării legislației) și unul pentru operatorul din sectorul hranei pentru animale (apărare). În final, poate fi prelevat un eșantion final pentru referință. În cazul în care eșantionul agregat complet se omogenizează, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat, cu excepția cazului în care această procedură este contrară reglementărilor statelor membre în ceea ce privește dreptul operatorului din sectorul hranei pentru animale.

**4. APARATURA**

- 4.1. Aparatura de prelevare de eșantioane trebuie să fie realizată din materiale care nu contaminatează produsele de eșantionat. Aparatura care este destinată a fi utilizată de mai multe ori trebuie să fie ușor de curățat pentru a evita contaminarea încrucișată.

**4.2. Aparatura recomandată pentru prelevarea eșantioanelor din furaje solide****4.2.1. Prelevarea manuală****4.2.1.1. Lopată plată cu margini verticale**

- 4.2.1.2. Sondă de eșantionare cu o fantă lungă sau compartimentată. Dimensiunile sondei de eșantionare trebuie să fie adecvate caracteristicilor lotului eșantionat (adâncimea recipientului, dimensiunile sacului etc.) și dimensiunilor particulelor furajului.

În cazul în care sonda de eșantionare are mai multe orificii, pentru a se asigura faptul că eșantionul este prelevat în diferite locuri de-a lungul sondei, orificiile ar trebui să fie separate prin compartimente sau orificii eșalonate secvențial.

**4.2.2. Prelevarea mecanică**

Pentru prelevarea de eșantioane din furajele în mișcare poate fi utilizată aparatură mecanică adecvată. „Adecvată” înseamnă că cel puțin întreaga secțiune a fluxului este eșantionată.

Prelevarea de eșantioane din furajele în mișcare (la rate de debit ridicat) poate fi efectuată de prelevatoare automate.

**4.2.3. Separator**

În cazul în care acest lucru este posibil și oportun, aparatura destinată divizării eșantionului în părți aproximativ egale ar trebui să se utilizeze pentru prepararea eșantioanelor reduse în mod reprezentativ.

▼ **M3**

## 5. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE NUMĂRUL DE EȘANTIOANE ELEMENTARE

- Cerințele cantitative la punctele 5.1 și 5.2 în ceea ce privește numărul de eșantioane elementare sunt aplicabile pentru loturile eșantionate cu dimensiuni de până la maximum 500 de tone și care pot fi eșantionate în mod reprezentativ. Procedura de eșantionare descrisă este, de asemenea, valabilă pentru cantități mai mari decât dimensiunea maximă a lotului eșantionat cu condiția ca numărul maxim de eșantioane elementare indicate în tabelele de mai jos să fie ignorată, numărul de eșantioane elementare fiind determinat prin formula cu rădăcina pătrată prevăzută în partea corespunzătoare a procedurii (a se vedea punctul 5.3) și dimensiunea minimă a eșantionului agregat să fi crescut proporțional. Acest lucru nu împiedică împărțirea unui lot mare în subloturi mai mici și eșantionarea fiecărui sublot în conformitate cu procedura descrisă la punctele 5.1 și 5.2.
- Dimensiunea lotului eșantionat trebuie să permită eșantionarea fiecăreia dintre părțile sale constituente.
- Pentru loturile sau subloturile foarte mari (> 500 de tone) și pentru loturile care sunt transportate sau depozitate în așa fel încât eșantionarea nu poate fi efectuată în conformitate cu procedura de eșantionare prevăzută la punctele 5.1 și 5.2 din prezentul capitol, trebuie aplicată procedura de eșantionare prevăzută la punctul 5.3.
- În cazul în care legislația impune operatorului din sectorul hranei pentru animale să se conformeze prezentului regulament în cadrul unui sistem de monitorizare obligatorie, operatorul din sectorul hranei pentru animale se poate abate de la cerințele cantitative prevăzute în prezentul capitol pentru a lua în considerare caracteristicile operaționale, cu condiția ca el să fi demonstrat, într-un mod satisfăcător pentru autoritatea competentă, echivalența procedurii de eșantionare în ceea ce privește reprezentativitatea și după autorizarea din partea autorității competente.
- În cazuri excepționale, dacă nu este posibil să se aplice metoda de eșantionare prevăzută în ceea ce privește cerințele cantitative din cauza unei deteriorări comerciale inacceptabile a lotului (din cauza formelor ambalajului, a mijlocului de transport, a modului de depozitare etc.), se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare cu condiția ca aceasta să fie cât mai reprezentativă posibil și să fie descrisă și documentată integral.

5.1. **Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje**5.1.1. *Furaje vrac solide*

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	$\sqrt{20}$ înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat (*), până la 40 de eșantioane elementare

(\*) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.

▼ **M3**5.1.2. *Furaje vrac lichide*

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de eşantioane elementare
≤ 2,5 tone sau ≤ 2 500 de litri	4 (*)
> 2,5 tone sau > 2 500 de litri	7 (*)

(\*) În cazul în care nu este posibil să se obțină omogenizarea lichidului, numărul de eşantioane elementare trebuie să crească.

5.1.3. *Furaje ambalate*

Furajele (solide și lichide) pot fi ambalate în pungi, saci, cutii de metal, cuve etc. care sunt menționate în tabel ca unități. Unitățile mari (≥ 500 kg sau litri) trebuie să fie eşantionate în conformitate cu dispozițiile prevăzute pentru furaje vrac (a se vedea punctele 5.1.1 și 5.1.2)

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de unități din care trebuie prelevat (cel puțin) un eşantion elementar (*)
1-20 de unități	1 unitate (**)
21-150 de unități	3 unități (**)
151-400 de unități	5 unități (**)
> 400 de unități	$\frac{1}{4}$ din $\sqrt{\text{numărul de unități care compun lotul eşantionat (***)}}$ , până la 40 de unități

(\*) În cazul în care deschiderea unei unități ar putea afecta analiza (de exemplu, în cazul furajelor umede perisabile), un eşantion elementar va fi reprezentat de unitatea nedeschisă.

(\*\*) Pentru unitățile al căror conținut nu depășește 1 kg sau 1 litru, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originare.

(\*\*\*) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.

5.1.4. *Blocuri de furaje și brichete minerale*

Minimum un bloc sau o brichetă trebuie eşantionat(ă) per lot eşantionat de 25 de unități, până la un maximum de patru blocuri sau brichete.

În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.

5.1.5. *Furaje grosiere/nutreț*

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de eşantioane elementare (*)
≤ 5 tone	5
> 5 tone	$\sqrt{5}$ înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eşantionat (**), până la 40 de eşantioane elementare

(\*) Este recunoscut faptul că în anumite situații (de exemplu, furaje însilozate) nu este posibil să se preleveze eşantioanele elementare necesare, fără a cauza daune inacceptabile pentru lot. În astfel de situații se poate aplica o metodă alternativă de eşantionare și va fi elaborat un ghid pentru eşantionarea unor astfel de loturi înainte de intrarea în vigoare a prezentului regulament.

(\*\*) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.

▼ **M3****5.2. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje**

Aceste cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare trebuie utilizate în următoarele situații:

- controlul aflatoxinelor, al cornului-secarei, al altor micotoxine și impurități botanice dăunătoare în materiile prime furajere;
- controlul contaminării încrucișate printr-un constituent, inclusiv material MG, sau substanță pentru care este preconizată o distribuție neuniformă în materiile prime furajere.

În cazul în care autoritatea de control are serioase suspiciuni privind apariția unei astfel de distribuții neuniforme și în cazul unei contaminări încrucișate printr-un constituent sau printr-o substanță într-un furaj combinat, se pot aplica cerințele cantitative, astfel cum sunt prevăzute în tabelul de mai jos.

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
< 80 de tone	A se vedea cerințe cantitative de la punctul 5.1. Numărul de eșantioane elementare care trebuie prelevate trebuie să fie înmulțit cu 2,5
≥ 80 de tone	100

**5.3. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare în cazul loturilor de dimensiuni foarte mari**

În cazul loturilor mari eșantionate (loturi eșantionate > 500 de tone), numărul de eșantioane elementare care trebuie prelevate = 40 de eșantioane elementare +  $\sqrt{\text{tone}}$  în ceea ce privește controlul substanțelor sau produselor distribuite uniform în masa de furaje sau 100 de eșantioane elementare +  $\sqrt{\text{tone}}$  în ceea ce privește controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje.

**6. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIONUL AGREGAT**

Este necesar un singur eșantion agregat per lot eșantionat.

	Natura furajelor	Dimensiunea minimă a eșantionului agregat (*) (**)
6.1.	Furaje vrac	4 kg
6.2.	Furaje ambalate:	4 kg (***)



## ▼M3

Este necesară un singur eșantion agregat per lot eșantionat.

	Natura furajelor	Dimensiunea minimă a eșantionului agregat (*) (**)
6.3.	Furaje lichide sau semilichide:	4 l
6.4.	Blocuri de furaje sau brichete minerale:	
6.4.1.	cântărind mai mult de 1 kg fiecare	4 kg
6.4.2.	cântărind cel mult 1 kg fiecare	greutatea a patru blocuri sau brichete originare
6.5.	Furaje grosiere/nutreț	4 kg (***)

(\*) În cazul în furajele eșantionate au o valoare ridicată, se prelevează o cantitate mai mică de eșantion agregat cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.

(\*\*) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) nr. 619/2011 al Comisiei din 24 iunie 2011 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor în vederea detectării materialului modificat genetic pentru care o procedură de autorizare este în curs de desfășurare sau a cărui autorizare a expirat (JO L 166, 25.6.2011, p. 9), eșantionul agregat pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului agregat trebuie să fie de cel puțin 10,5 kg și pentru soia de 7 kg. Pentru alte semințe și boabe, precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului agregat de 4 kg corespunde unui număr de peste 35 000 de semințe.

(\*\*\*) În cazul furajelor ambalate, poate fi posibil, de asemenea, să nu se atingă dimensiunea de 4 kg pentru eșantionul agregat în funcție de dimensiunea unităților individuale.

(\*\*\*\*) În cazul în care se referă la furajele grosiere sau la nutreț cu o greutate specifică redusă (de exemplu, fân, paie), eșantionul agregat ar trebui să aibă o dimensiune minimă de 1 kg.

## 7. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIOANELE FINALE

### *Eșantioane finale*

Este necesară analiza a cel puțin un eșantion final. Cantitatea din eșantionul final de analizat nu poate fi mai mică decât cantitățile de mai jos:

Furaje solide	500 g (*) (**) (***)
Furaje lichide sau semilichide	500 ml (*)

(\*) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) nr. 619/2011, eșantionul final pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 10 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului final trebuie să fie de cel puțin 3 000 g și pentru soia de 2 000 g. Pentru alte semințe și boabe precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului final de 500 g corespunde unui număr de peste 10 000 de semințe.

(\*\*) În cazul în care dimensiunea eșantionului agregat este semnificativ mai mică de 4 kg sau litri (a se vedea notele de subsol de la punctul 6), se poate preleva, de asemenea, o cantitate mai mică de eșantion final, cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.

(\*\*\*) În cazul eșantionării leguminoaselor, boabelor de cereale și fructelor nucifere pentru determinarea reziduurilor de pesticide, dimensiunea minimă a eșantionului final este de 1 kg în conformitate cu dispozițiile Directivei 2002/63/CE a Comisiei (JO L 187, 16.7.2002, p. 30).

**▼ M3****8. METODA DE EȘANTIONARE PENTRU LOTURI FOARTE MARI SAU LOTURI DEPOZITATE SAU TRANSPORTATE ÎNTR-UN MOD CARE NU PERMITE EȘANTIONAREA ÎNTREGULUI LOT****8.1. Principii generale**

În cazul în care modul de transport sau de depozitare a unui lot nu permite prelevarea de eșantioane elementare din întregul lot, eșantionarea unor astfel de loturi ar trebui, de preferință, să fie efectuată atunci când lotul se află în flux.

În cazul antrepozitelor mari destinate să stocheze furajele, operatorii ar trebui să fie încurajați să instaleze echipamente în antrepozit care să permită eșantionarea (automată) a întregului lot stocat.

În cazul aplicării procedurilor de eșantionare prevăzute în prezentul capitol 8, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul său este informat cu privire la procedura de eșantionare. În cazul în care procedura de eșantionare este pusă sub semnul întrebării de către operatorul din sectorul hranei pentru animale sau de către reprezentantul acestuia, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul acestuia va permite autorității competente să preleveze eșantioane din întregul lot pe cheltuiala sa.

**8.2. Loturile mari transportate pe cale navală****8.2.1. Eșantionarea dinamică a loturilor mari transportate pe cale navală**

Eșantionarea loturilor mari în nave se efectuează de preferință în timp ce produsul este în flux (eșantionare dinamică).

Eșantionarea se face per stivă (entitate care poate fi separată fizic). Stivele sunt, totuși, golite parțial una după alta, astfel încât separarea fizică inițială nu mai există după transferul în instalațiile de depozitare. Prin urmare, eșantionarea poate fi efectuată în funcție de separarea fizică inițială sau în funcție de separarea după transferul în instalațiile de depozitare.

Descărcarea unei nave poate dura câteva zile. În mod normal, eșantionarea trebuie să fie efectuată la intervale de timp regulate pe întreaga durată a descărcării. Cu toate acestea, nu este întotdeauna posibil sau adecvat pentru un inspector oficial să fie prezent pentru eșantionare pe parcursul întregii operațiuni de descărcare. Prin urmare, se permite eșantionarea unei părți (lot eșantionat) din întregul lot. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat.

În cazul eșantionării unei părți a unui lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

Chiar dacă eșantionul oficial este prelevat automat, prezența unui inspector este necesară. Cu toate acestea, în cazul în care se efectuează o prelevare automată cu parametri prestabiliți care nu pot fi schimbați în cursul eșantionării și eșantioanele elementare sunt colectate într-un recipient închis, împiedicând orice posibilă fraudă, prezența unui inspector este necesară numai la începutul eșantionării, de fiecare dată când recipientul în care se află eșantioanele trebuie să fie schimbat și la sfârșitul eșantionării.

**▼ M3****8.2.2. Eșantionarea loturilor transportate pe cale navală prin eșantionare statică**

În cazul în care eșantionarea se efectuează în mod static, trebuie aplicată aceeași procedură ca și cea prevăzută pentru spațiile de depozitare (silozuri) accesibile din partea de sus (a se vedea punctul 8.4.1).

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă (de sus) din lot/stivă. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

**8.3. Eșantionarea loturilor mari depozitate în antrepozite**

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

**8.4. Prelevarea de eșantioane din spații de depozitare (silozuri)****8.4.1. Prelevarea de eșantioane din silozuri (ușor) accesibile din partea de sus**

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

**8.4.2. Prelevarea de eșantioane din silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise)****8.4.2.1. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea > 100 de tone**

Furajele depozitate în astfel de silozuri nu pot fi eșantionate în mod static. Prin urmare, în cazul în care furajele din siloz trebuie să fie eșantionate și nu există nicio posibilitate de a deplasa lotul, trebuie să se ajungă la un acord cu operatorul conform căruia acesta trebuie să informeze inspectorul cu privire la momentul în care silozul va fi descărcat pentru a permite eșantionarea atunci când furajul este în flux.

**8.4.2.2. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea < 100 de tone**

Procedura de eșantionare implică introducerea într-un recipient a unei cantități de 50-100 kg și prelevarea eșantionului din aceasta. Dimensiunea eșantionului agregat corespunde cu întregul lot, iar numărul de eșantioane elementare este legat de cantitatea din siloz introdusă într-un recipient pentru eșantionare. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.

**▼ M3****8.5. Eșantionarea furajelor vrac în recipiente mari închise**

Adezea, astfel de loturi pot fi eșantionate numai atunci când sunt descărcate. În anumite cazuri nu este posibil să se descarce loturile la punctul de import sau de control și, prin urmare, eșantionarea ar trebui să aibă loc atunci când aceste recipiente sunt descărcate.

**9. INSTRUCȚIUNI PENTRU PRELEVAREA, PREPARAREA ȘI AMBALAREA EȘANTIOANELOR****9.1. Generalități**

Eșantioanele trebuie prelevate și preparate fără întârzieri inutile, luând în considerare precauțiile necesare pentru a garanta că produsul nu este nici modificat, nici contaminat. Instrumentele, precum și suprafețele de lucru și recipientele destinate colectării de eșantioane trebuie să fie curate și uscate.

**9.2. Eșantioane elementare**

Eșantioanele elementare trebuie prelevate în mod aleatoriu din întregul lot eșantionat, iar dimensiunile lor trebuie să fie aproximativ egale.

Dimensiunea eșantionului elementar este de cel puțin 100 de grame sau 25 de grame în cazul furajelor grosiere sau al nutrețului cu o greutate specifică redusă.

În cazul în care, în conformitate cu normele pentru procedura de eșantionare stabilite la punctul 8, trebuie prelevate mai puțin de 40 de eșantioane elementare, dimensiunea eșantioanelor elementare se determină în funcție de dimensiunea necesară a eșantionului agregat (a se vedea punctul 6).

În cazul eșantionării loturilor de dimensiuni reduse de furaje ambalate în cazul cărora, conform cerințelor cantitative, trebuie prelevat un număr limitat de eșantioane elementare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originare al cărei conținut nu depășește 1 kg sau un litru.

În cazul eșantionării furajelor ambalate compuse din unități mici (de exemplu, < 250 g), dimensiunea eșantionului elementar depinde de dimensiunea unității.

**9.2.1. Furaje vrac**

După caz, eșantionarea poate fi efectuată atunci când lotul eșantionat este în flux (încărcare sau descărcare).

**9.2.2. Furaje ambalate**

După selectarea numărului necesar de unități pentru eșantionare, conform indicațiilor din capitolul 5, o parte a conținutului fiecărei unități se îndepărtează folosind o sondă sau o lopată. Dacă este necesar, eșantioanele se prelevează după ce unitățile au fost golite separat.

**9.2.3. Furaje lichide sau semilichide, omogene sau omogenizabile**

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile din capitolul 5, conținutul se omogenizează, dacă este necesar, și se prelevează o cantitate din fiecare unitate.

Eșantioanele elementare pot fi prelevate la descărcarea conținutului.

▼ **M3**9.2.4. *Furaje lichide sau semilichide, neomogenizabile*

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile din capitolul 5, se prelevează eșantioane de la diferite niveluri.

Eșantioanele se pot preleva și în timpul descărcării conținutului, dar primele fracțiuni se îndepărtează.

În oricare dintre cazuri, volumul total prelevat nu trebuie să fie mai mic de 10 litri.

9.2.5. *Blocuri de furaje și brichete minerale*

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de blocuri sau brichete, conform indicațiilor din capitolul 5, se prelevează o parte din fiecare bloc sau brichetă. În cazul în care există suspiciuni legate de un bloc sau de o brichetă neomogen(ă), întregul bloc sau întreaga brichetă poate fi considerat(ă) ca eșantion.

În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.

9.3. **Prepararea eșantioanelor agregat**

Eșantioanele elementare se amestecă pentru a forma un singur eșantion agregat.

9.4. **Prepararea eșantioanelor finale**

Materialul din eșantionul agregat se amestecă cu grijă <sup>(1)</sup>.

— Fiecare eșantion este introdus într-un recipient corespunzător. Se iau toate precauțiile necesare pentru evitarea oricărei modificări de compoziție a eșantionului, a contaminării sau a falsificării, care ar putea avea loc în timpul transportării sau depozitării.

— În cazul controlului constituenților sau substanțelor uniform distribuite în întregul furaj, eșantionul agregat poate fi redus în mod reprezentativ la cel puțin 2 kg sau 2 l (eșantion redus) <sup>(2)</sup>, de preferință, prin utilizarea fie a unui separator mecanic, fie a unui separator automat. Pentru controlul prezenței de reziduuri de pesticide în leguminoase, boabe de cereale și fructe nucifere, dimensiunea minimă a eșantionului redus este de 3 kg. În cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator sau separatorul nu este disponibil, eșantionul poate fi redus prin metoda sferturilor. Din eșantioanele reduse se prepară eșantioanele finale (pentru control, apărare și referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la capitolul 7. În cazul controlului constituenților, inclusiv materialul modificat genetic sau substanțele care ar putea fi distribuite neuniform în materiile prime furajere, eșantionul agregat trebuie să fie:

— complet omogenizat și împărțit ulterior în eșantioane finale; sau

— redus la cel puțin 2 kg sau 2 l <sup>(3)</sup> prin utilizarea unui separator mecanic sau automat. Numai în cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator, eșantionul poate, dacă este necesar, să fie redus prin metoda sferturilor. Pentru controlul prezenței materialului modificat genetic în temeiul Regulamentului (UE) nr. 619/2011, eșantionul redus trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe pentru a permite obținerea eșantioanelor finale de cel puțin 10 000 de semințe pentru asigurarea respectării legislației, apărare și referință [a se vedea nota de subsol (\*\*\*) din capitolul 6 și nota de subsol (\*) din capitolul 7].

<sup>(1)</sup> Orice aglomerări se destramă (dacă este cazul, prin separarea lor de eșantion, urmată de reincorporarea lor în eșantion).

<sup>(2)</sup> Cu excepția cazului în care este vorba de furaje grosiere sau de nutreț cu o greutate specifică redusă.

<sup>(3)</sup> Cu excepția cazului în care este vorba de furaje grosiere sau de nutreț cu o greutate specifică redusă.

**▼ M3****9.5. Ambalarea eșantioanelor**

Recipientele sau ambalajele se sigilează și se etichetează astfel încât să nu poată fi deschise fără a deteriora sigiliul. Eticheta completă se încorporează în sigiliu.

**9.6. Expedierea eșantioanelor către laborator**

Eșantionul trebuie să fie trimis fără întârzieri inutile la laboratorul analitic desemnat, împreună cu informațiile necesare laborantului.

**10. PROCESUL-VERBAL DE EȘANTIONARE**

Pentru fiecare eșantion se întocmește un proces-verbal, care permite identificarea fără ambiguități a lotului eșantionat și a dimensiunii acestuia.

Procesul-verbal trebuie să menționeze, de asemenea, orice abatere de la procedura de eșantionare, astfel cum se prevede în prezentul regulament.

Procesul verbal trebuie pus atât la dispoziția laboratorului de control oficial, cât și la dispoziția operatorului din sectorul hranei pentru animale și/sau a laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale.

▼ **M3***ANEXA II***DISPOZIȚII GENERALE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ A FURAJELOR****A. PREPARAREA EȘANTIOANELOR PENTRU ANALIZĂ****1. Obiectiv**

Procedurile descrise mai jos se referă la prepararea pentru analiză a eșantioanelor trimise laboratoarelor de control după eșantionare conform dispozițiilor prevăzute în anexa I.

Eșantioanele de laborator trebuie pregătite astfel încât cantitățile prelevate, astfel cum se prevede în metodele de analiză, să fie omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

**2. Precauțiile ce trebuie luate**

Procedura de preparare a eșantioanelor care trebuie urmată este în funcție de metodele de analiză care trebuie utilizate și de constituenții sau substanțele care trebuie controlate. De aceea, este extrem de important să se garanteze faptul că procedura de preparare a eșantioanelor urmată este adecvată pentru metoda de analiză utilizată și pentru constituenții sau substanțele care trebuie controlate.

Toate operațiunile necesare trebuie să se efectueze astfel încât să se evite, pe cât posibil, contaminarea eșantionului și modificarea compoziției acestuia.

Măcinarea, amestecarea și cernerea se efectuează fără întârziere în condițiile unei expuneri minime a eșantionului la aer și la lumină. Nu se utilizează rășnițe sau aparate de măcinat care ar putea cauza încălzirea semnificativă a eșantionului.

Se recomandă ca furajele foarte sensibile la căldură să fie măcinate manual. Trebuie, de asemenea, să se asigure că aparatul în sine nu constituie o sursă de contaminare.

Dacă prepararea nu poate fi efectuată fără modificări semnificative ale conținutului de umiditate al eșantionului, se determină conținutul de umiditate înainte și după preparare, în conformitate cu metoda menționată în partea A din anexa III.

**3. Procedură****3.1. Procedura generală**

Alicota de test este prelevată din eșantionul final. Formarea unui con și selectarea de sferturi nu sunt recomandate deoarece ar putea să se formeze alicote de test care să dea naștere la erori de separare mari.

**3.1.1. Furaje care pot fi măcinate ca atare**

— Se amestecă eșantionul final trecut prin sită și se introduce într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă din nou pentru a asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantității pentru analiză (alicota de test).

**3.1.2. Furaje care pot fi măcinate după uscare**

— Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, eșantionul final se deshidratează astfel încât umiditatea sa să se reducă la 8-12 %, în conformitate cu procedura de preuscare descrisă la punctul 4.3 din metoda de determinare a umidității menționată în partea A din anexa III. Se procedează apoi în conformitate cu indicațiile din secțiunea 3.1.1.

▼ **M3**

## 3.1.3. Furaje lichide sau semilichide

- Se recoltează eșantionul final într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un sistem de închidere ermetică. Se amestecă cu grijă pentru a se asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantității pentru analiză (alicota de test).

## 3.1.4. Alte furaje

- Eșantioanele finale care nu pot fi preparate conform uneia dintre procedurile indicate anterior se tratează prin orice altă procedură prin care se asigură că cantitățile prelevate pentru analiză (alicota de test) sunt omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

3.2. *Proceduri specifice în cazul examinării prin inspecție vizuală sau la microscop sau în cazurile în care întregul eșantion agregat se omogenizează*

- În cazul unei examinări prin inspecție vizuală (fără a recurge la microscop), întregul eșantion de laborator se utilizează pentru examinare.
- În cazul unei examinări microscopice, laboratorul poate reduce eșantionul agregat sau poate efectua o reducere ulterioară a eșantionului redus. Eșantioanele finale pentru apărare și, în cele din urmă, pentru referință sunt prelevate în urma unei proceduri echivalente cu procedura urmată pentru eșantionul final pentru asigurarea respectării legislației.
- În cazul în care întregul eșantion agregat este omogenizat, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat.

4. **Depozitarea eșantioanelor**

Eșantioanele trebuie păstrate la o temperatură care să nu le altereze compoziția. Eșantioanele destinate analizării prezenței vitaminelor sau substanțelor foarte sensibile la lumină se păstrează în condiții care să garanteze că eșantionul nu este afectat în mod negativ de lumină.

**B. DISPOZIȚII PRIVIND REACTIVII ȘI APARATURA UTILIZATE ÎN METODELE DE ANALIZĂ**

1. Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, toți reactivii destinați analizelor trebuie să fie puri din punct de vedere analitic (p.a.). Pentru analiza prezenței oligoelementelor, puritatea reactivilor se controlează printr-un test martor. În funcție de rezultatele obținute, poate fi necesară o purificare suplimentară a reactivilor.
2. Pentru orice operație care implică prepararea soluțiilor, diluția, clătirea sau spălarea, menționate în metodele de analiză și pentru care nu există indicații referitoare la natura solventului sau diluantului, se utilizează apa. Ca regulă generală, se utilizează apă demineralizată sau distilată. În cazuri speciale, care sunt indicate în metodele de analiză, apa trebuie supusă unor proceduri de purificare speciale.
3. Având în vedere dotarea uzuală a laboratoarelor de control, în metodele de analiză se menționează doar instrumentele și aparatura speciale sau care au utilizări specifice. Ele trebuie să fie curate, în special în cazul determinării unor cantități foarte mici de substanțe.



**▼ M3****C. APLICAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI PREZENTAREA REZULTATELOR****1. Procedura de extracție**

O serie de metode determină o procedură de extracție specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de extracție decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de extracție utilizată are, pentru matricea analizată, o eficiență de extracție echivalentă cu procedura menționată în metodă.

**2. Procedura de purificare**

O serie de metode determină o procedură de purificare specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de purificare decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de purificare utilizată determină, pentru matricea analizată, rezultate analitice echivalente cu procedura menționată în metodă.

**3. Numărul determinărilor**

În cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile, dacă rezultatul primei determinări este semnificativ ( $> 50\%$ ) mai mic decât specificația de control, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări, ținând seama de incertitudinea de măsurare, se utilizează pentru verificarea conformității.

În cazul controlului privind conținutul declarat pentru o anumită substanță sau un anumit ingredient, dacă rezultatul primei determinări confirmă conținutul declarat, adică rezultatul analizei se situează în interiorul intervalului de variație acceptat, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări, ținând seama de incertitudinea de măsurare, se utilizează pentru verificarea conformității.

În unele cazuri, intervalul de variație acceptabil respectiv este definit în legislație, de exemplu, în Regulamentul (CE) nr. 767/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 13 iulie 2009 privind introducerea pe piață și utilizarea furajelor, de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului și de abrogare a Directivei 79/373/CEE a Consiliului, a Directivei 80/511/CEE a Comisiei, a Directivelor 82/471/CEE, 83/228/CEE, 93/74/CEE, 93/113/CE și 96/25/CE ale Consiliului și a Deciziei 2004/217/CE a Comisiei <sup>(1)</sup>.

**4. Raportarea metodei de analiză utilizate**

Raportul de analiză menționează metoda de analiză utilizată.

**5. Raportarea rezultatului analitic**

Rezultatul analitic se exprimă în maniera indicată în metoda de analiză, cu un număr adecvat de zecimale și se ajustează, dacă este cazul, la conținutul de umiditate al eșantionului final înainte de preparare.

<sup>(1)</sup> JO L 229, 1.9.2009, p. 1.

**▼ M3****6. Incertitudinea de măsurare și rata de recuperare în cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile**

În ce privește substanțele indezirabile, în sensul Directivei 2002/32/CE, un produs destinat utilizării în furaje se consideră neconform cu conținutul maxim stabilit dacă rezultatul analitic, referitor la un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat ca depășind conținutul maxim, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată se utilizează după ce a fost corectată pentru recuperare și după deducerea incertitudinii de măsurare extinse. Această procedură este aplicabilă doar în cazurile în care metoda de analiză permite estimarea incertitudinii de măsurare și ajustarea pentru recuperare (de exemplu, imposibilă în cazul analizelor la microscop).

Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare și a ratei de recuperare):

- (a) ajustat pentru recuperare, nivelul de recuperare fiind indicat. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %;
- (b) ca „ $x \pm U$ ”, unde  $x$  este rezultatul analitic și  $U$  este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.

Totuși, dacă rezultatul analizei este semnificativ (> 50 %) mai mic decât specificația de control și cu condiția ca procedurile calitative corespunzătoare să fie aplicate și ca analiza să servească doar verificării conformității cu prevederile legale, rezultatul analitic ar putea fi raportat fără ajustare pentru recuperare, iar raportarea ratei de recuperare și a incertitudinii de măsurare ar putea fi omisă în aceste cazuri.



ANEXA III

**METODE DE ANALIZĂ DE CONTROL AL COMPOZIȚIEI  
MATERIILOR PRIME FURAJERE ȘI AL FURAJELOR COMBINATE**

A. DETERMINAREA UMIDITĂȚII

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea conținutului de umiditate al furajelor. În cazul furajelor care conțin substanțe volatile, cum sunt acizii organici, este de notat că o dată cu determinarea conținutului de umiditate se determină și cantități semnificative de substanțe volatile.

Metoda nu se aplică în cazul analizei produselor lactate utilizate ca materii prime furajere, analizei substanțelor minerale și a amestecurilor compuse în principal din substanțe minerale, analizei grăsimilor și uleiurilor de origine animală și vegetală sau analizei semințelor și a fructelor oleaginoase.

2. **Principiu**

Eșantionul se deshidratează în condiții specificate, care variază în funcție de natura furajelor. Scăderea greutății se determină prin cântărire. Este necesar să se efectueze o uscare prealabilă atunci când se analizează furaje solide cu conținut ridicat de umiditate.

3. **Aparatură**

3.1. Moară construită dintr-un material care nu absoarbe umiditatea, ușor de curățat, care permite o zdrobire rapidă și uniformă, fără a provoca încălzire semnificativă, care evită pe cât posibil contactul cu aerul exterior și care corespunde cerințelor menționate la punctele 4.1.1 și 4.1.2 (de exemplu, micro-mori cu ciocane sau răcite cu apă, mori conice pliabile sau mori cu mecanism lent sau cu discuri dințate).

3.2. Balanță analitică, cu toleranță de 1 mg.

3.3. Recipiente uscate din metal care nu se corodează sau din sticlă cu capace ermetice; suprafața de lucru permite împrăștierea eşantionului până la aproximativ 0,3 g/cm<sup>2</sup>.

3.4. Cuptor izoterm cu încălzire electrică ( $\pm 2$  °C), ventilat corespunzător și care asigură o reglare rapidă a temperaturii <sup>(1)</sup>.

3.5. Cuptor vidat cu încălzire electrică, reglabil, dotat cu o pompă de ulei și cu: fie un mecanism de introducere a aerului fierbinte uscat, fie un agent de desicare (de exemplu, oxid de calciu).

3.6. Desicator cu o placă din metal sau porțelan, groasă, perforată, conținând un agent de desicare eficient.

4. **Procedura**

*N.B.* Operațiile descrise în această secțiune se efectuează imediat după deschiderea ambalajelor care conțin eşantioanele. Analizele trebuie să fie efectuate cel puțin în duplicat.

<sup>(1)</sup> Pentru uscarea cerealelor, a făinii fine, a tărațelor și a făinii grunjoase, cuptorul trebuie să aibă o capacitate termică astfel încât, atunci când este prestabilă la 131 °C, va reveni la temperatura respectivă în mai puțin de 45 de minute după ce în interior a fost plasat un număr maxim de eşantioane de testat, în vederea uscării simultane. Ventilația trebuie să fie astfel încât, atunci când un număr cât mai mare de eşantioane de grâu comun pe care le poate conține sunt supuse uscării timp de două ore, rezultatele diferă de cele obținute după patru ore de uscare cu mai puțin de 0,15 %.

**▼B**4.1. *Preparare*

## 4.1.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.1.2 și 4.1.3

Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Dacă este necesar, se zdrobește sau se divizează astfel încât să se evite orice variație a conținutului de umiditate (a se vedea punctul 6).

## 4.1.2. Cereale și tărâțe

Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Se macină în particule din care cel puțin 50 % trec printr-o sită cu orificii de 0,5 mm și care nu determină un reziduu mai mare de 10 % în cazul folosirii unei site cu orificii rotunde cu diametru de 1 mm.

## 4.1.3. Furaje lichide sau păstoase, furaje constituite în mod predominant din uleiuri și grăsimi

Se prelevează aproximativ 25 g din eșantion, se cântărește cu o abatere de 10 mg, se adaugă o cantitate adecvată de nisip anhidru cântărită cu o abatere de 10 mg și se amestecă până la obținerea unui produs omogen.

4.2. *Uscare*

## 4.2.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.1.2 și 4.1.3

Se cântărește un recipient (3.3) împreună cu capacul său, cu o abatere de 1 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul încălzit în prealabil la 103 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de patru ore, calculate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 103 °C. Se pune capacul pe recipient, acesta din urmă se scoate din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.

În cazul furajelor constituite în mod predominant din uleiuri și grăsimi, uscarea în cuptor se prelungeste cu 30 de minute, la 103 °C. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

## 4.2.2. Cereale, făină fină, tărâțe și făină grunjoasă

Se cântărește un recipient (3.3) împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion măcinat și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul încălzit în prealabil la 130 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de două ore, considerate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 130 °C. Se pune capacul pe recipient, acesta din urmă se scoate din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.

## 4.2.3. Furaje combinate conținând peste 4 % zaharoză sau lactoză: materii prime furajere precum semințele de roșcove, produsele cerealiere hidrolizate, semințele de malț, bucăți de sfeclă uscată, solubilizate de pește și zaharuri; furaje combinate conținând peste 25 % săruri minerale care înglobează apă de cristalizare.

Se cântărește un recipient (3.3) împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul vidat (3.5) încălzit în prealabil la o temperatură cuprinsă între 80 și 85 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil.

Se aduce presiunea la 100 Torr și se lasă la uscat, la această presiune, timp de patru ore, fie într-un curent de aer uscat și cald, fie cu ajutorul unui agent de desicare (aproximativ 300 g pentru 20 de eșantioane). În al doilea caz, pompa de vid se deconectează după ce se obține presiunea

▼B

recomandată. Durata de uscare se calculează din momentul în care temperatura în cuptor revine la o valoare cuprinsă între 80 și 85 °C. Presiunea cuptorului se readuce cu grijă până la nivelul presiunii atmosferice. Se deschide cuptorul, se așează imediat capacul pe recipient, se scoate recipientul din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. Uscarea în cuptorul vidat se prelungește cu încă 30 de minute la o temperatură cuprinsă între 80 și 85 °C și se recântărește. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

4.3. *Uscarea prealabilă*

## 4.3.1. Furaje care nu sunt menționate la punctul 4.3.2

Furajele solide al căror conținut de umiditate este ridicat, făcând dificilă zdrobirea, trebuie să fie supuse uscării prealabile, după cum urmează:

Se cântăresc, cu o abatere de 10 mg, 50 g de eșantion *nemăcinat* (dacă este cazul, furajele comprimate sau aglomerate pot fi divizate cu aproximație) într-un recipient corespunzător (de exemplu, un taler de aluminiu de 20 × 12 cm cu bordură de 0,5 cm). Se lasă la uscat într-un cuptor la o temperatură cuprinsă între 60 și 70 °C, până ce conținutul de umiditate s-a redus la o valoare cuprinsă între 8 și 12 %. Se scoate din cuptor, se lasă să se răcească, neacoperit, în laborator, timp de o oră și se cântărește cu o abatere de 10 mg. Se zdrobește imediat conform indicațiilor de la punctul 4.1.1 și se usucă conform indicațiilor de la punctul 4.2.1 sau 4.2.3, în funcție de natura furajului.

4.3.2. *Cereale*

Grăunțele cu un conținut de umiditate mai mare de 17 % trebuie să fie supuse uscării prealabile, după cum urmează:

Se cântăresc, cu o abatere de 10 mg, 50 g de grăunțe *nemăcinate* într-un recipient corespunzător (de exemplu, un taler de aluminiu de 20 × 12 cm cu bordură de 0,5 cm). Se lasă la uscat într-un cuptor, timp de 5-7 minute, la temperatura de 130 °C. Se scot din cuptor, se lasă să se răcească, neacoperit, în laborator, timp de două ore și se cântăresc cu o abatere de 10 mg. Se macină imediat conform indicațiilor de la punctul 4.1.2 și se usucă conform indicațiilor de la punctul 4.2.2.

5. **Calculul rezultatelor**

Conținutul de umiditate (X) al eșantionului, în procente, se calculează prin utilizarea formulelor următoare:

5.1. *Uscare fără uscare prealabilă*

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

unde:

m = greutatea inițială, în grame, a eșantionului de testat;

m<sub>0</sub> = greutatea, în grame, a eșantionului de testat uscat.

5.2. *Uscare cu uscare prealabilă*

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

unde:

m = greutatea inițială, în grame, a eșantionului de testat;

m<sub>1</sub> = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după uscare prealabilă;

m<sub>2</sub> = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după zdrobire sau măcinare;

m<sub>0</sub> = greutatea, în grame, a eșantionului de testat uscat.

**▼ B**5.3. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășește 0,2 % din valoarea absolută pentru umiditate.

6. **Observație**

Dacă zdrobirea se dovedește a fi necesară și dacă această acțiune poate modifica conținutul de umiditate al produsului, rezultatele analizei referitoare la componentele furajelor trebuie ajustate în funcție de conținutul de umiditate al eșantionului în starea lui inițială.

**B. DETERMINAREA UMIDITĂȚII DIN GRĂSIMILE ȘI ULEIURILE ANIMALE ȘI VEGETALE**

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea conținutului în apă și substanțe volatile din grăsimile și uleiurile animale și vegetale.

2. **Principiu**

Eșantionul se usucă până la atingerea greutateii constante (pierderea de greutate între două cântăriri succesive este mai mică sau egală cu 1 mg) la 103 °C. Pierderea de greutate se determină prin cântărire.

3. **Aparatură**

- 3.1. Vas cu fund plat, din material rezistent la coroziune, cu diametru de 8-9 cm și adâncime de aproximativ 3 cm.
- 3.2. Termometru cu bulb întărit și cu tub de expansiune la capătul superior, gradat de la aproximativ 80 °C până la cel puțin 110 °C și lung de aproximativ 10 cm.
- 3.3. Cuvă cu nisip sau plită.
- 3.4. Desicator, conținând un agent de uscare eficient.
- 3.5. Balanță analitică.

4. **Procedura**

Se cântăresc, cu o abatere de 1 mg, aproximativ 20 g din eșantionul omogenizat, în recipientul uscat și cântărit (3.1), conținând termometrul (3.2). Se încălzește pe cuva cu nisip sau pe plită (3.3), amestecând continuu cu termometrul, astfel încât temperatura să ajungă la 90 °C în aproximativ 7 minute.

Se reduce intensitatea căldurii, urmărind frecvența cu care bulele se ridică de pe fundul vasului. Temperatura nu trebuie să depășească 105 °C. Se continuă amestecarea, răzuind fundul vasului, până când bulele încetează să se mai formeze.

Pentru a asigura eliminarea completă a umidității, se reîncălzește de câteva ori la 103 ± 2 °C, răcind la 93 °C între încălziri succesive. În continuare se lasă să se răcească la temperatura camerei în desicator (3.4) și se cântărește. Se repetă această operație până când pierderea de greutate dintre două încălziri succesive nu depășește 2 mg.

*N.B.* O creștere a greutateii eșantionului după încălzire repetată indică oxidarea grăsimilor, caz în care rezultatul se calculează prin cântărirea imediat înainte ca greutatea să înceapă să crească.

5. **Calculul rezultatelor**

Conținutul de umiditate ( $X$ ), ca procentaj din eșantion, este dat de următoarea formulă:

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

**▼ B**

unde:

$m$  = greutatea, în grame, a eșantionului de testat;

$m_1$  = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său înainte de încălzire;

$m_2$  = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său după încălzire.

Rezultatele mai mici de 0,05 % se înregistrează ca fiind „sub 0,05 %”.

*Repetabilitate*

Diferența de umiditate dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,05 %, în valoare absolută.

**C. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE BRUTE****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite determinarea conținutului de proteine brute din furaje pe baza conținutului de azot, determinat conform metodei Kjeldahl.

**2. Principiu**

Eșantionul se dizolvă cu acid sulfuric în prezența unui catalizator. Soluția acidă se alcalinizează cu soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul se distilează și se colectează într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, al cărui exces se titrează cu o soluție etalon de hidroxid de sodiu.

Ca alternativă, amoniacul eliberat se distilează într-o soluție de acid boric în exces, urmat de titrare cu o soluție de acid clorhidric sau acid sulfuric.

**3. Reactivi**

- 3.1. Sulfat de potasiu.
- 3.2. Catalizator: oxid de cupru (II) CuO sau sulfat de cupru (II) pentahidrat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3.3. Zinc granulat.
- 3.4. Acid sulfuric,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.
- 3.5. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$  mol/l.
- 3.6. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$  mol/l.
- 3.7. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$  mol/l.
- 3.8. Indicator roșu de metil; se dizolvă 300 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol,  $\sigma = 95-96$  % (v/v).
- 3.9. Soluție de hidroxid de sodiu (se poate utiliza soluție de calitate tehnică)  $\beta = 40$  g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard,  $c(\text{NaOH}) = 0,25$  mol/l.
- 3.11. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard,  $c(\text{NaOH}) = 0,1$  mol/l.
- 3.12. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată.
- 3.13. Acetanilidă (m.p. = 114 °C, conținutul în N = 10,36 %).
- 3.14. Zaharoză (fără azot).
- 3.15. Acid boric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).
- 3.16. Soluție indicator de roșu de metil: se dizolvă 100 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol sau metanol.

**▼B**

- 3.17. Soluție de verde de bromocrezol: se dizolvă 100 mg de verde de bromocrezol în 100 ml de etanol sau metanol.
- 3.18. Soluție de acid boric (10-40 g/l, în funcție de aparatura utilizată).

Când se aplică detectarea prin colorimetrie a punctului final, indicatorii roșu de metil și bromocrezol trebuie adăugați la soluțiile de acid boric. Dacă se prepară 1 litru de soluție de acid boric, înainte de ajustarea de volum, se adaugă 7 ml de soluție de indicator roșu de metil (3.16) și 10 ml de soluție verde de bromocrezol (3.17).

În funcție de apa utilizată, pH-ul soluției de acid boric poate diferi de la lot la lot. Adesea este necesară o ajustare cu ajutorul unui mic volum de substanță alcalină pentru a obține un martor pozitiv.

*Notă:* Adăugarea a aproximativ 3-4 ml de NaOH (3.11) în 1 litru de acid boric 10 g/l boric oferă, de obicei, ajustări bune. Soluția se păstrează la temperatura camerei și, pe durata păstrării, se protejează de lumină și de surse de vapori de amoniac.

- 3.19. Acid clorhidric, soluție volumetrică standard,  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

*Notă:* Dacă în calcule se fac ajustările necesare, se pot folosi alte concentrații de soluții volumetrică (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 și 3.19). Concentrațiile se exprimă întotdeauna cu patru zecimale.

#### 4. Aparatură

Aparatură adecvată pentru efectuarea dizolvării, distilării și titrării conform procedurii Kjeldahl.

#### 5. Procedură

##### 5.1. Dizolvarea

Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 0,001 g și se transferă eșantionul în vasul aparatului de dizolvare. Se adaugă 15 g de sulfat de potasiu (3.1), o cantitate adecvată de catalizator (3.2) [0,3-0,4 g oxid de cupru (II) sau 0,9-1,2 g sulfat de cupru (II) pentahidrat], 25 ml de acid sulfuric (3.4) și, dacă este necesar, câteva granule de piatră ponce (3.12), apoi se amestecă.

Se încălzește vasul, la început moderat, agitând circular din când, dacă este cazul, până când materia s-a carbonizat și spuma a dispărut; apoi se încălzește mai intens, până când lichidul fierbe constant. Încălzirea este adecvată dacă acidul aflat în fierbere se condensează pe peretele vasului. Se previne supraîncălzirea marginilor și lipirea particulelor organice de acestea.

Când soluția devine limpede și de culoare verde deschis, se continuă fierberea timp de încă două ore, apoi se lasă să se răcească.

##### 5.2. Distilarea

Se adaugă cu atenție apă suficientă pentru a asigura dizolvarea completă a sulfatilor. Se lasă la răcit și apoi se adaugă, dacă este cazul, câteva granule de zinc (3.3). Se procedează ca la punctul 5.2.1 sau 5.2.2.

##### 5.2.1. Distilarea în acid sulfuric

În vasul de colectare al aparatului de distilare se introduce o cantitate de 25 ml de acid sulfuric (3.5) sau (3.7), măsurată cu exactitate, în funcție de conținutul estimat de azot. Se adaugă câteva picături de indicator roșu de metil (3.8).



**▼B**

Se conectează vasul de dizolvare la condensatorul aparatului de distilare și se scufundă capătul condensatorului în lichidul din vasul de colectare până la o adâncime de cel puțin 1 cm (a se vedea observația 8.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.9) în vasul de dizolvare, fără pierderi de amoniac (a se vedea observația 8.1). Se încălzește vasul până la distilarea completă a amoniacului.

#### 5.2.2. Distilarea în acid boric

În cazul în care titrarea amoniacului conținut în distilat se face manual, se aplică procedura de mai jos. În cazul în care unitatea de distilare este complet automatizată, inclusiv titrarea amoniacului conținut în distilat, se urmează instrucțiunile de operare a unității de distilare puse la dispoziție de fabricant.

Sub orificiul de evacuare al condensatorului se așează un vas de colectare conținând 25-30 ml de soluție de acid boric (3.18), astfel încât tubul de evacuare se află sub nivelul suprafeței soluției de acid boric în exces. Se reglează unitatea de distilare astfel încât să elibereze 50 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.9). Unitatea de distilare se operează în conformitate cu instrucțiunile fabricantului, distilându-se complet amoniacul eliberat prin adăugarea de soluție de hidroxid de sodiu. Distilatul se colectează în soluția de acid boric receptoare. Cantitatea de distilat (timpul de distilare în vapori) depinde de cantitatea de azot din eșantion. Se urmează instrucțiunile fabricantului.

*Notă:* În cazul unei unități de distilare semiautomate, adăugarea hidroxidului de sodiu în exces și distilarea în vapori se efectuează automat.

#### 5.3. Titrarea

Se procedează ca la punctul 5.3.1 sau 5.3.2.

##### 5.3.1. Acid sulfuric

Se titrează excesul de acid sulfuric în vasul de colectare cu soluție de hidroxid de sodiu (3.10 sau 3.11), în funcție de concentrația acidului sulfuric utilizat, până se atinge punctul final.

##### 5.3.2. Acid boric

Cu ajutorul unei biurete se titrează conținutul vasului de colectare cu soluție volumetrică standard de acid clorhidric (3.19) sau cu soluție volumetrică standard de acid sulfuric (3.6) și se citește cantitatea de soluție de titrare utilizată.

Când se aplică detectarea colorimetrică a punctului final, acesta este atins la prima apariție în conținut a culorii roz. Citirea biuretei se estimează cu o abatere de 0,05 ml. Vizualizarea punctului final poate fi facilitată de o placă de agitator magnetic iluminat sau de un detector fotometric.

Aceasta poate fi efectuată automat prin utilizarea unui aparat de distilare cu vapori cu titrare automată.

Operarea specifică a aparatului de distilare sau a celui de distilare/titrare se face conform instrucțiunilor fabricantului.

*Notă:* În cazul în care se utilizează un sistem automat de titrare, aceasta începe imediat după începerea distilării și se utilizează soluția de acid boric 1 % (3.18).

**▼ B**

În cazul care se utilizează o unitate de distilare complet automată, titrarea automată a amoniacului poate fi efectuată, de asemenea, prin detectarea punctului final cu ajutorul unui sistem pH potențiomtric.

În acest caz, se utilizează un aparat de titrare automat, cu pH-metru. pH-metrul se calibrează corespunzător în intervalul de pH 4-7, folosindu-se proceduri de laborator normale de calibrare a pH-ului.

Punctul final al titrării exprimat în pH este atins la valoarea de 4,6, reprezentând punctul cel mai de jos al curbei de titrare (punctul de inflexiune).

5.4. *Testul martor*

Pentru a confirma faptul că reactivii nu conțin azot, se efectuează un test martor (dizolvare, distilare și titrare), folosind 1 g de zaharoză (3.14) în locul eșantionului.

6. **Calculul rezultatelor**

Calcularea se efectuează în conformitate cu punctul 6.1 sau 6.2.

6.1. *Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.1*

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

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

unde:

$V_0$  = volumul (ml) de NaOH (3.10 sau 3.11) folosit în testul martor;  
 $V_1$  = volumul (ml) de NaOH (3.10 sau 3.11) folosit în titrarea eșantionului;

$c$  = concentrația (mol/l) a hidroxidului de sodiu (3.10 sau 3.11);

$m$  = greutatea (g) a eșantionului.

6.2. *Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.2*6.2.1. *Titrare cu acid clorhidric*

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

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

unde:

$m$  = greutatea (g) a părții de testat;

$c$  = concentrația (mol/l) a soluției volumetric standard de acid clorhidric (3.19);

$V_0$  = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în testul martor;

$V_1$  = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în partea de testat.

6.2.2. *Titrare cu acid sulfuric*

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

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

**▼ B**

unde:

$m$  = greutatea (g) a părții de testat;

$c$  = concentrația (mol/l) a soluției volumetric standard de acid sulfuric (3.6);

$V_0$  = volumul (în ml) de acid sulfuric (3.6) utilizat în testul martor;

$V_1$  = volumul (în ml) de acid sulfuric (3.6) utilizat în testul martor.

## 7. Verificarea metodei

### 7.1. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 0,2 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %;

— 1 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %;

— 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %.

### 7.2. Acuratețea

Analiza (dizolvare, distilare și titrare) se efectuează pe 1,5-2 g acetanilidă (3.13), în prezența a 1 g zaharoză (3.14); 1 g de acetanilidă consumă 14,8 ml de acid sulfuric (3.5). Recuperarea trebuie să fie de cel puțin 99 %.

## 8. Observații

8.1. Aparatura poate fi de tip manual, semiautomat sau automat. Dacă aparatura necesită un transfer între etapele de dizolvare și distilare, acest transfer trebuie realizat fără pierderi. Dacă vasul aparatului de distilare nu este prevăzut cu o pâlnie de picurare, se adaugă hidroxidul de sodiu imediat înainte de conectarea vasului la condensator, turnând încet lichidul pe marginea vasului.

8.2. Dacă produsul de dizolvare se solidifică, se reîncepe determinarea folosind o cantitate mai mare de acid sulfuric (3.4) decât cea menționată anterior.

8.3. Pentru produsele cu conținut scăzut de azot, volumul de acidul sulfuric (3.7) care trebuie introdus în vasul de colectare poate fi redus, dacă este cazul, la 10 sau 15 ml și completat până la 25 ml cu apă.

8.4. Pentru analizele curente, în vederea determinării conținutului de proteine brute se pot aplica metode alternative de analiză, dar metoda Kjeldahl descrisă în prezenta parte C este metoda de referință. Echivalența dintre rezultatele obținute cu metoda alternativă (de exemplu DUMAS) și cele obținute prin metoda de referință trebuie demonstrată pentru fiecare matrice în mod individual. Întrucât rezultatele obținute cu o metodă alternativă, chiar și după verificarea echivalenței, pot devia ușor față de rezultatele obținute cu metoda de referință, este necesar a menționa în raportul analitic metoda de analiză utilizată pentru determinarea conținutului de proteine brute.

## D. DETERMINAREA UREEI

### 1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea conținutului de uree din furaje.

**▼ B****2. Principiu**

Eșantionul este pus în suspensie în apă, în care s-a adăugat un produs de limpezire. Suspensia se filtrează. Conținutul în uree al filtratului este determinat după adăugarea de 4-dimetilaminobenzaldehidă (4-DMAB), prin măsurarea densității optice la o lungime de undă de 420 nm.

**3. Reactivi**

- 3.1. Soluție de 4-dimetilaminobenzaldehidă: se dizolvă 1,6 g de 4-DMAB în 100 ml de etanol 96 % și se adaugă 10 ml de acid clorhidric ( $\rho_{20}$  1,19 g/ml). Acest reactiv se conservă timp de maximum două săptămâni.
- 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.4. Cărbune activ care nu absoarbe ureea (de controlat).
- 3.5. Uree, soluție 0,1 % (greutate/volum).

**4. Aparatură**

- 4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.
- 4.2. Eprubete: 160 × 16 mm cu dopuri de sticlă șlefuită.
- 4.3. Spectrofotometru.

**5. Procedură****5.1. Analiza eșantionului**

Se cântăresc 2 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 1 g de cărbune activ (3.4) într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml de apă și 5 ml de soluție Carrez I (3.2), se amestecă timp de aproximativ 30 secunde și se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (3.3). Se amestecă timp de treizeci de minute în agitator. Se completează volumul cu apă, se agită și se filtrează.

Se îndepărtează 5 ml de filtrat transparent și incolor, se introduc în eprubete cu dop de sticlă șlefuită, se adaugă 5 ml de soluție de 4-DMAB (3.1) și se amestecă. Se introduc eprubetele într-o baie de apă la 20 °C ( $\pm 4$  °C). După cincisprezece minute se măsoară densitatea optică a soluției de eșantion cu spectrofotometrul la 420 nm. Se compară cu soluția de reactivi pentru testul martor.

**5.2. Curba de calibrare**

Se îndepărtează volume de 1, 2, 4, 5 și 10 ml din soluția de uree (3.5), se introduc în baloanele gradate de 100 ml și se completează volumul cu apă. Se îndepărtează 5 ml din fiecare soluție, se adaugă în fiecare 5 ml de soluție 4-DMAB (3.1), se omogenizează și se măsoară densitatea optică conform indicațiilor de mai sus cu o soluție martor care conține 5 ml de 4-DMAB și 5 ml de apă în care nu există uree. Se trasează curba de calibrare.

**6. Calculul rezultatelor**

Se determină cantitatea de uree din eșantion cu ajutorul curbei de calibrare.

Se exprimă rezultatul ca procent din eșantion.

**7. Observații**

- 7.1. În cazul unui conținut de uree care depășește 3 %, se reduce greutatea eșantionului la 1 g sau se diluează soluția inițială astfel încât să nu fie mai mult de 50 mg de uree în 500 ml.

**▼B**

- 7.2. În cazul unui conținut mic în uree, se crește greutatea eșantionului atâta timp cât filtratul rămâne transparent și incolor.
- 7.3. Dacă eșantionul conține compuși de azot simpli cum ar fi aminoacizii, densitatea optică se măsoară la 435 nm.

**E. DETERMINAREA BAZELOR AZOTATE VOLATILE****I. PRIN MICRODIFUZIE****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinare conținutului de baze azotate volatile, exprimate ca amoniac, din furaje.

**2. Principiu**

Eșantionul este supus extracției cu apă, iar soluția este limpezită și filtrată. Bazele azotate volatile sunt dislocate prin microdifuzie cu ajutorul unei soluții de carbonat de potasiu, colectate într-o soluție de acid boric și titrate cu acid sulfuric.

**3. Reactivi**

- 3.1. Acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum).
- 3.2. Indicator: se dizolvă 33 mg de verde de bromocrezol și 65 mg de roșu de metil în 100 ml de alcool etilic 95-96 % (v/v).
- 3.3. Soluție de acid boric: într-un balon gradat de 1 l se dizolvă 10 g de acid boric în 200 ml de alcool etilic 95-96 % (v/v) și 700 ml de apă. Se adaugă 10 ml de indicator (3.2). Se amestecă și, dacă este necesar, se ajustează colorația soluției la roșu deschis prin adăugarea unei soluții de hidroxid de sodiu. 1 ml din această soluție permite fixarea a maximum 300 μg de NH<sub>3</sub>.
- 3.4. Soluție saturată de carbonat de potasiu: se dizolvă 100 g de carbonat de sodiu în 100 ml de apă la temperatura de fierbere. Se lasă să se răcească și se filtrează.
- 3.5. Acid sulfuric 0,01 mol/litru.

**4. Aparatură**

- 4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.
- 4.2. Celule Conway (a se vedea diagrama) din sticlă sau din material plastic.
- 4.3. Microbiurete gradate la 1/100 ml.

**5. Procedură**

Se cântăresc 10 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 100 ml de apă într-un balon gradat de 200 ml. Se amestecă sau se agită în agitator timp de 30 de minute. Se adaugă 50 ml de soluție de acid tricloracetic (3.1), se completează volumul cu apă, se agită cu putere și se filtrează printr-un un filtru cutat.

Cu ajutorul unei pipete se introduce 1 ml de soluție de acid boric (3.3) în partea centrală a celei Conway și 1 ml de filtrat de eșantion în coroana celei. Se acoperă parțial cu ajutorul unui capac lubrifiat. Se picură cu rapiditate 1 ml de soluție saturată de carbonat de potasiu (3.4) în coroană și se închide capacul astfel încât celula este ermetizată. Se întoarce celula cu precauție, rotind-o în plan orizontal, astfel încât cei doi reactivi se amestecă. Se lasă la incubat fie timp de cel puțin patru ore la temperatura camerei, fie timp de o oră la 40 °C.

Cu ajutorul unei microbiurete (4.3), se titrează bazele volatile din soluția de acid boric cu acid sulfuric (3.5).

Se efectuează un test martor aplicând aceeași procedură, dar fără a analiza un eșantion.

▼ **B****6. Calculul rezultatelor**

1 ml de  $H_2SO_4$  0,01 mol/litru corespunde la 0,34 mg de amoniac.

Se exprimă rezultatul ca procent din eșantion.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășește:

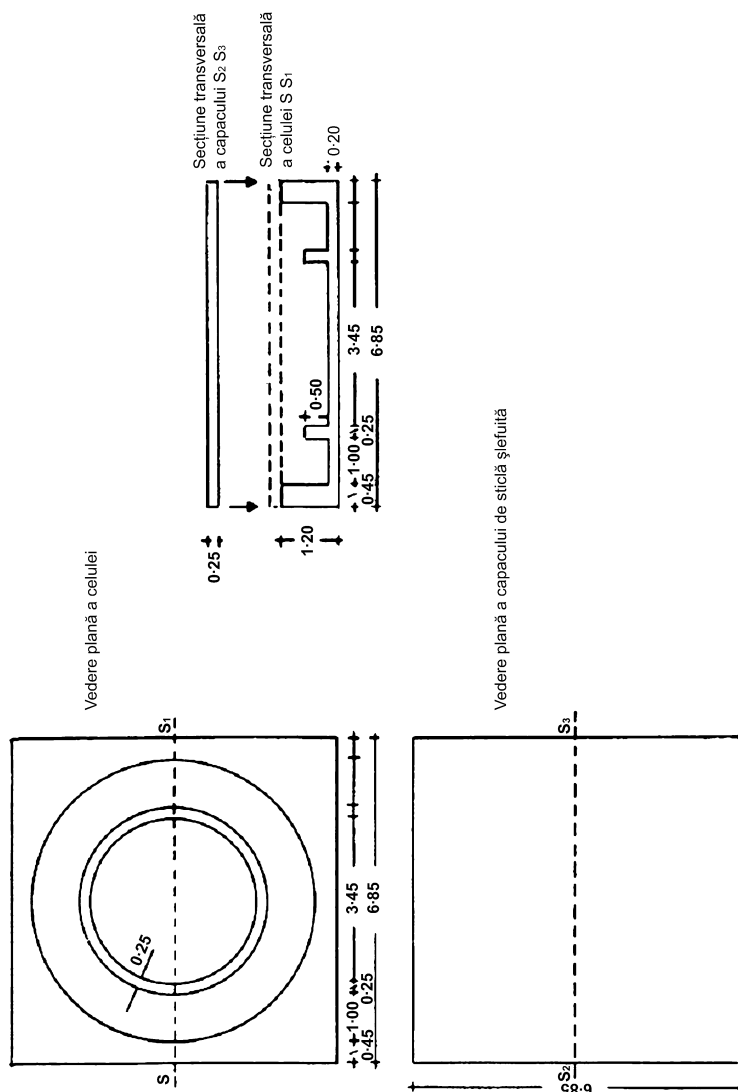
- 10 %, în valoare relativă, pentru un conținut în amoniac mai mic de 1 %;
- 0,1 %, în valoare absolută, pentru un conținut în amoniac de 1 % sau mai mare.

**7. Observație**

Dacă conținutul în amoniac al eșantionului depășește 0,6 %, se diluează filtratul inițial.

**CELULA CONWAY**

Scara 1/1



**▼B****II. PRIN DISTILARE****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea conținutului de baze azotate volatile, exprimate ca amoniac, a făinii din pește care practic nu conține deloc uree. Ea este aplicabilă doar în cazul unui conținut în amoniac mai mic de 0,25 %.

**2. Principiu**

Eșantionul este supus extracției cu apă, iar soluția este limpezită și filtrată. Bazele azotate volatile sunt dislocate la punctul de fierbere prin adăugare de oxid de magneziu și colectate într-o cantitate determinată de acid sulfuric, al cărui exces este retitrat cu o soluție de hidroxid de sodiu.

**3. Reactivi**

- 3.1. Acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum).
- 3.2. Oxid de magneziu.
- 3.3. Emulsie antispumantă (de exemplu, silicon).
- 3.4. Acid sulfuric 0,05 mol/litru.
- 3.5. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru.
- 3.6. Soluție de roșu de metil 0,3 % în etanol 95-96 % (v/v).

**4. Aparatură**

- 4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 de rpm.
- 4.2. Aparat de distilat de tip Kjeldahl.

**5. Procedură**

Se cântăresc 10 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 100 ml de apă într-un balon gradat de 200 ml. Se amestecă sau se agită în agitator timp de 30 de minute. Se adaugă 50 ml de soluție de acid tricloracetic (3.1), se completează volumul cu apă, se agită cu putere și se filtrează printr-un filtru cutat.

Se prelevează o cantitate de filtrat limpede adecvată pentru conținutul în baze azotate volatile presupus (100 ml este de obicei suficient). Se diluează la 200 ml și se adaugă 2 g de oxid de magneziu (3.2), precum și câteva picături de emulsie antispumantă (3.3). Soluția trebuie să fie alcalină la testul cu turnesol; dacă nu este, se adaugă oxid de magneziu (3.2). Se continuă ca la punctul 5.2 și 5.3 al metodei de analiză pentru determinarea conținutului de proteine brute (partea C a prezentei anexe).

Se efectuează un *test martor* aplicând aceeași procedură, dar fără a analiza un eșantion.

**6. Calculul rezultatelor**

1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol/litru corespunde la 1,7 mg de amoniac.

Se exprimă rezultatul ca procent din eșantion.

*Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășește, în valoare relativă, 10 % amoniac.

**F. DETERMINAREA AMINOACIZILOR (CU EXCEPȚIA TRIPTOFANULUI)****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea aminoacizilor liberi (sintetici și naturali) și totali (legați în peptide și liberi) din furaje, folosind un

**▼ B**

analizator de aminoacizi. Ea este aplicabilă următorilor aminoacizi: cist(e)ină, metionină, lizină, treonină, alanină, arginină, acid aspartic, acid glutamic, glicină, histidină, izoleucină, leucină, fenilalanină, prolină, serină, tirozină și valină.

Metoda nu deosebește sărurile aminoacizilor și nu permite diferențierea între formele D și L ale aminoacizilor. Ea nu este valabilă pentru determinarea triptofanului sau a analogilor hidroxilați ai aminoacizilor.

**2. Principiu****2.1. Aminoacizi liberi**

Aminoacizii liberi se extrag cu acid clorhidric diluat. Macromoleculele azotate coextrase se precipită cu acid sulfosalicilic și se îndepărtează prin filtrare. Soluția filtrată se ajustează la pH-ul de 2,2. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni și se determină prin reacție cu ninhidrină cu detecție fotometrică la 570 nm.

**2.2. Aminoacizi totali**

Procedura aleasă depinde de aminoacizii care sunt analizați. Cist(e)ina și metionina trebuie oxidate la acid cistic și, respectiv, metionin sulfonă înainte de hidroliză. Tirozina trebuie determinată în hidrolizate de eşantioane neoxidate. Toți ceilalți aminoacizi enumerați la punctul 1 se pot determina fie în eşantionul oxidat, fie în eşantionul neoxidat.

Oxidarea se realizează la 0 °C cu ajutorul unui amestec de acid performic și fenol. Reactivul de oxidare în exces se descompune cu disulfid de sodiu. Eşantionul oxidat sau neoxidat se hidrolizează cu acid clorhidric (3.20) timp de 23 de ore. Hidrolizatul se ajustează la pH-ul de 2,2. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni și se determină prin reacție cu ninhidrină folosind detecția fotometrică la 570 nm (440 nm pentru prolină).

**3. Reactivi**

Trebuie utilizată apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 µS).

- 3.1. Peroxid de hidrogen, g (g/g) = 30 %.
- 3.2. Acid formic, g (g/g) = 98-100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Disulfid de sodiu.
- 3.5. Hidroxid de sodiu.
- 3.6. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat.
- 3.7. Acid clorhidric, cu densitate de aproximativ 1,18 g/ml.
- 3.8. Citrat trisodic dihidrat.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglicol).
- 3.10. Clorură de sodiu.
- 3.11. Ninhidrină.
- 3.12. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.
- 3.13. Norleucină sau alt compus adecvat pentru a fi utilizat ca etalon intern.



**▼B**

- 3.14. Azot, gaz (< 10 ppm oxigen).
- 3.15. 1-octanol.
- 3.16. Aminoacizi.
- 3.16.1. Substanțe standard enumerate la punctul 1. Compuși puri care nu conțin deloc apă de cristalizare. Înainte de utilizare, se usucă în vid cu ajutorul  $P_2O_5$  sau al  $H_2SO_4$ , timp de 1 săptămână.
- 3.16.2. Acid cistic.
- 3.16.3. Metionin sulfonă.
- 3.17. Soluție de hidroxid de sodiu,  $c = 7,5 \text{ mol/l}$   
Se dizolvă 300 g de NaOH (3.5) în apă și se completează până la 1 litru.
- 3.18. Soluție de hidroxid de sodiu,  $c = 1 \text{ mol/l}$   
Se dizolvă 40 g de NaOH (3.5) în apă și se completează până la 1 litru.
- 3.19. Soluție de acid formic-fenol:  
Se amestecă 889 g de acid formic (3.2) cu 111 g de apă și se adaugă 4,73 g de fenol (3.3).
- 3.20. Mixtură de hidroliză,  $c = 6 \text{ mol HCl/l}$  conținând 1 g de fenol/l:  
Se adaugă 1 g de fenol (3.3) la 492 ml de HCl (3.7) și se completează cu apă până la 1 litru.
- 3.21. Mixtură de extracție,  $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$  conținând 2 % tiodiglicol: se iau 8,2 ml de HCl (3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml de apă, se adaugă 20 ml de tiodiglicol (3.9) și se completează cu apă până la 1 litru (nu se amestecă direct 3.7 și 3.9).
- 3.22. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat,  $\beta = 6 \%$ :  
se dizolvă 60 g de acid 5-sulfosalicilic (3.6) în apă și se completează cu apă până la 1 litru.
- 3.23. Mixtură de oxidare (acid performic-fenol):  
Se amestecă 0,5 ml de peroxid de hidrogen (3.1) cu 4,5 ml soluție de acid formic-fenol (3.19) într-un mic pahar de laborator. Se incubează la 20-30 °C timp de 1 oră pentru a se forma acid performic, apoi se răcește în baie de apă cu gheață (15 minute) înainte de a se adăuga la eșantion.  
Atenție: a se evita contactul cu pielea și a se purta îmbrăcăminte protectoare.
- 3.24. Soluție tampon de citrat,  $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$ , pH 2,2:  
Se dizolvă 19,61 g de citrat de sodiu (3.8), 5 ml de tiodiglicol (3.9), 1 g de fenol (3.3) și 16,5 ml de HCl (3.7) în aproximativ 800 ml de apă. Se ajustează pH-ul la 2,2. Se completează cu apă până la 1 litru.
- 3.25. Soluții tampon de eluție, preparate în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (4.9).
- 3.26. Reactiv ninhidrină, preparat în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (4.9).
- 3.27. Soluții etalon de aminoacizi. Aceste soluții se păstrează la o temperatură sub 5 °C.

**▼ B**

## 3.27.1. Soluție etalon stoc de aminoacizi (3.16.1).

$c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$  pentru fiecare, în acid clorhidric.

Se pot obține din surse comerciale.

3.27.2. Soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă,  $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$ .

Se dizolvă 0,2115 g de acid cisteic (3.16.2) și 0,2265 g de metionin sulfonă (3.16.3) în soluție tampon de citrat (3.24) într-un balon gradat de 1 litru și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat. Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 12 luni. Această soluție nu se utilizează dacă soluția etalon stoc (3.27.1) conține acid cisteic și metionin sulfonă.

3.27.3. Soluție etalon stoc de etalon intern, de exemplu, norleucină,  $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ .

Se dizolvă 0,656 g de norleucină (3.13) în soluție tampon de citrat (3.24) într-un balon gradat și se completează cu soluție tampon de citrat până la 250 ml. Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 6 luni.

3.27.4. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate,  $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  de acid cisteic și metionin sulfonă și  $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  din ceilalți aminoacizi. Se dizolvă 2,2 g de clorură de sodiu (3.10) într-un pahar de laborator de 100 ml care conține 30 ml soluție tampon de citrat (3.24). Se adaugă 4 ml de soluție etalon stoc de aminoacizi (3.27.1), 4 ml soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă (3.27.2) și 0,5 ml soluție etalon stoc de etalon intern (3.27.3), dacă este cazul. Se ajustează pH-ul la valoarea 2,2 cu hidroxid de sodiu (3.18).

Se transferă cantitativ într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (3.24) și se amestecă.

Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni.

A se vedea și observația de la punctul 9.1.

## 3.27.5. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate preparată în conformitate cu punctul 5.3.3.1 și pentru utilizare cu extracte (5.2). Soluția de calibrare se prepară în conformitate cu 3.27.4 dar omițând clorura de sodiu.

Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni.

**4. Aparatură**

## 4.1. Balon cu fund rotund de 100 sau 250 ml dotat cu un condensator cu reflux.

## 4.2. Sticlă din borosilicat, de 100 ml, cu un dop filetat cu căpșușeală de cauciuc/teflon (de exemplu, Duran, Schott) pentru utilizare în cuptor.

4.3. Cuptor cu ventilație forțată și un regulator de temperatură cu precizie mai mare de  $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.4. pH-metru (cu trei zecimale).

4.5. Filtru cu membrană (0,22  $\mu\text{m}$ ).

## 4.6. Centrifugă.

## 4.7. Evaporator rotativ cu vid.

## 4.8. Agitator mecanic sau magnetic.

**▼ B**

- 4.9. Analizor de aminoacizi sau echipament HPLC cu coloană schimbătoare de ioni, dispozitiv pentru ninhidrină, derivare post-coloană și detector fotometric.

Coloana este umplută cu rășini de polistiren sulfonat capabile să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. Fluxul din liniile cu soluție tampon și ninhidrină este asigurat de pompe care au o stabilitate a fluxului de  $\pm 0,5\%$  în perioada care include atât funcționarea în vederea calibrării standardului, cât și analiza eșantionului.

În cazul unor analizori de aminoacizi se pot utiliza proceduri de hidrolizare în care hidrolizatul are o concentrație de sodiu de  $c = 0,8$  mol/l și conține întreaga cantitate de acid formic rezidual din etapa de oxidare. Alți analizori nu oferă o separare satisfăcătoare a anumitor aminoacizi dacă hidrolizatul conține exces de acid formic și/sau concentrații mari de ioni de sodiu. În acest caz, volumul de acid se reduce prin evaporare la aproximativ 5 ml după hidroliză și înainte de ajustarea pH-ului. Evaporarea se face sub vid, la o temperatură maximă de 40 °C.

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea eșantionului*

Se macină eșantionul astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer, la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate înainte de măcinare. Eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (3.12) înainte de măcinare.

5.2. *Determinarea aminoacizilor liberi în furaje și în premixuri*

Se cântărește cu o abatere de 0,2 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer și se adaugă 100 ml de extract de mixtură (3.21). Se agită mixtura timp de 60 minute cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (4.8). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator de 100 ml.

Se adaugă 5 ml de soluție de acid sulfosalicilic (3.22) în cursul agitării și se continuă agitarea cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 5 minute. Se filtrează sau se centrifughează supernatantul pentru a se îndepărta orice precipitat. Se introduc 10 ml din soluția rezultată într-un pahar de laborator de 100 ml și se ajustează pH-ul la valoarea de 2,2 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (3.18), se transferă într-un balon gradat de volum adecvat utilizându-se soluție tampon de citrat (3.24) și se completează până la semn cu soluția tampon (3.24).

Dacă se utilizează etalon intern, se adaugă 1 ml de etalon intern (3.27.3) pentru fiecare 100 ml de soluție finală și se completează până la semn cu soluție tampon (3.24).

Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Dacă extractele nu se examinează în aceeași zi, trebuie păstrate la o temperatură sub 5 °C.

5.3. *Determinarea conținutului total în aminoacizi*

5.3.1. *Oxidare*

Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g de eșantion preparat (5.1) într-un (într-o):

— balon cu fund rotund de 100 ml (4.1) pentru hidroliză în mediu deschis (5.3.2.3); sau

**▼B**

- balon cu fund rotund de 250 ml (4.1) dacă este necesară o concentrație mică de sodiu (5.3.3.1); sau
- sticlă de 100 ml dotată cu un dop filetat (4.2) pentru hidroliză în mediu închis (5.3.2.4).

Porția de eșantion cântărită are un conținut de azot de aproximativ 10 mg și un conținut de umiditate de maximum 100 mg.

Se introduce balonul/sticla într-o baie de apă cu gheață și se răcește la 0 °C, se adaugă 5 ml de mixtură de oxidare (3.23) și se amestecă cu ajutorul unei spatule de sticlă cu vârf încovoiat. Se etanșează balonul/sticla conținând spatula cu ajutorul unei pelicule ermetizante, se introduce baia de apă cu gheață conținând recipientul etanșizat într-un frigider la 0 °C și se lasă timp de 16 ore. După 16 ore, se scoate din frigider, iar excesul de reactiv de oxidare se descompune prin adăugarea a 0,84 g de disulfid de sodiu (3.4).

Se trece la 5.3.2.1.

### 5.3.2. Hidroliza

#### 5.3.2.1. *Hidroliza eșantioanelor oxidate*

La eșantioanele oxidate preparate în conformitate cu punctul 5.3.1 se adaugă 25 ml de mixtură hidrolizată (3.20) având grijă să se spele orice reziduu de eșantion de pe pereții vasului și de pe spatulă.

În funcție de procedura de hidrolizare utilizată, se trece la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

#### 5.3.2.2. *Hidroliza eșantioanelor neoxidate*

Se cântăresc 0,1-1 g de eșantion preparat (5.1), cu o abatere de 0,2 mg, fie într-un balon cu fund rotund de 100 ml sau 250 ml (4.1), fie într-o sticlă de 100 ml dotată cu dop filetat (4.2). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă cu grijă 25 ml de mixtură hidrolizată (3.20) și se amestecă cu eșantionul. Se procedează ca la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

#### 5.3.2.3. *Hidroliza în mediu deschis*

Se adaugă 3 mărgelile de sticlă în mixtura din balon (preparată conform mențiunilor de la punctul 5.3.2.1 sau 5.3.2.2) și se fierbe în clocot continuu sub reflux timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se spală condensatorul cu 5 ml de soluție tampon de citrat (3.24). Se deconectează balonul și se răcește într-o baie de apă cu gheață.

Se procedează ca la punctul 5.3.3.

#### 5.3.2.4. *Hidroliza în mediu închis*

Sticla conținând mixtura preparată conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2 se introduce în cuptor (4.3) la 110 °C. În timpul primei ore, pentru a se preveni o creștere progresivă a presiunii (datorată expansiunii substanțelor gazoase) și pentru a se evita o explozie, se plasează dopul filetat la nivelul extremității superioare a vasului. A nu se închide vasul cu dopul respectiv. După o oră, se închide vasul cu dopul respectiv și se lasă în cuptor (4.3) timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se îndepărtează sticla din cuptor, se scoate cu grijă dopul de la nivelul sticlei, iar aceasta se introduce într-o baie de apă cu gheață. Se lasă să se răcească.

În funcție de procedura de ajustare a pH-ului (5.3.3), se transferă cantitativ conținutul sticlei într-un pahar de laborator de 250 de ml sau într-un balon cu fund rotund, utilizând soluție tampon de citrat (3.24).

Se procedează ca la punctul 5.3.3.

**▼B**

## 5.3.3. Ajustarea pH-ului

În funcție de toleranța la sodiu a analizorului de aminoacizi (4.9), pentru ajustarea pH-ului se procedează ca la punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Pentru sistemele cromatografice (4.9) necesitând o concentrație de sodiu mică*

Este recomandabil să se utilizeze o soluție etalon stoc internă (3.27.3) în cazul în care se folosesc analizori de aminoacizi necesitând o concentrație mică de sodiu (în cazul în care volumul de acid trebuie redus).

În acest caz, la hidrolizat se adaugă 2 ml de soluție etalon stoc internă (3.27.3) înainte de evaporare.

La hidrolizatul obținut conform punctului 5.3.2.3 sau 5.2.3.4 se adaugă 2 picături de 1-octanol (3.15).

Utilizând un evaporator rotativ (4.7) se reduce volumul la 5-10 ml în condiții de vid la 40 °C. Dacă volumul este redus accidental la mai puțin de 5 ml, hidrolizatul trebuie aruncat, iar analiza trebuie repetată.

Se ajustează pH-ul la 2,2 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (3.18) și se procedează ca la punctul 5.3.4.

5.3.3.2. *Pentru toți ceilalți analizori de aminoacizi (4.9)*

Hidrolizatele obținute ca la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se neutralizează parțial prin adăugarea cu grijă, în condiții de agitare continuă, a 17 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.17), asigurându-se că temperatura este menținută sub 40 °C.

Se ajustează pH-ul la valoarea de 2,2 la temperatura camerei prin utilizarea soluției de hidroxid de sodiu (3.17) și în cele din urmă a soluției de hidroxid de sodiu (3.18) Se trece la punctul 5.3.4.

## 5.3.4. Soluția de eșantion pentru cromatografie

Se transferă cantitativ hidrolizatul cu pH ajustat (5.3.3.1 sau 5.3.3.2) cu soluție tampon de citrat (3.24) într-un balon gradat de 200 ml și se completează până la semn cu soluție tampon (3.24).

Dacă nu s-a utilizat deja un etalon intern, se adaugă 2 ml de etalon intern (3.27.3) și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (3.24). Se amestecă minuțios.

Se trece la etapa cromatografică (5.4).

Dacă soluțiile de eșantion nu se examinează în aceeași zi, ele se păstrează la o temperatură sub 5 °C.

5.4. *Cromatografia*

Înainte de cromatografie se aduce extractul (5.2) sau hidrolizatul (5.3.4) la temperatura camerei. Se agită mixtura și se filtrează o cantitate potrivită printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,22 μm (4.5). Soluția limpede rezultată se supune cromatografiei prin schimb ionic, utilizând un analizor de aminoacizi (4.9).

Injectarea poate fi efectuată manual sau automat. Este important ca aceeași cantitate de soluție ± 0,5 % să fie adăugată în coloană pentru analizarea etaloanelor și a eșantioanelor cu excepția situațiilor în care se utilizează un etalon intern și ca raporturile sodiu:aminoacizi în soluțiile de etalon și în cele de eșantion să fie cât mai similare posibil.

**▼B**

În general, frecvența manevrelor de calibrare depinde de stabilitatea reactivului ninhidrină și a sistemului analitic. Etalonul sau eșantionul se diluează cu soluție tampon de citrat (3.24) pentru a genera o arie a vârfului pentru etalon de 30-200 % din aria vârfului pentru eșantionul de aminoacid.

Cromatografia aminoacizilor va varia ușor în funcție de tipul analizorului și de rășina utilizate. Sistemul ales trebuie să fie capabil să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic generează un răspuns linear la modificările cantităților de aminoacizi adăugați la coloană.

În cursul etapei cromatografice se aplică rapoartele înălțimii corespunzătoare punctului minim:vârfului menționate mai jos, în cazul în care se analizează o soluție echimolară (de aminoacizi analizați). Această soluție echimolară trebuie să conțină cel puțin 30 % din cantitatea maximă de aminoacizi care poate fi măsurată cu precizie cu ajutorul sistemului analizor de aminoacizi (4.9).

Pentru separarea treoninei-serinei, în cazul suprapunerii a doi aminoacizi, raportul punct minim/vârf corespunzător aminoacidului situat mai jos pe cromatogramă nu trebuie să depășească 2:10. [dacă se determină doar cist(e)ina, metionina, treonina și lizina, separarea insuficientă a vârfurilor învecinate va influența în mod negativ determinarea]. Pentru toți ceilalți aminoacizi, separarea trebuie să fie mai bună de 1:10.

Sistemul trebuie să asigure că lizina se separă de „artefactele de lizină” și de ornitină.

## 6. Calculul rezultatelor

Aria vârfului pentru eșantion și etalon se măsoară pentru fiecare aminoacid în parte, iar cantitatea (X) se măsoară în g de aminoacid per kg de eșantion.

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

Dacă se utilizează un etalon intern se multiplică cu:  $\frac{D}{C}$

- A = aria vârfului, hidrolizat sau extract;
- B = aria vârfului, soluția etalon de calibrare;
- C = aria vârfului, etalon intern în hidrolizat sau extract;
- D = aria vârfului, etalon intern, soluția etalon de calibrare;
- M = greutatea molară a aminoacidului determinat;
- c = concentrația de standard în  $\mu\text{mol/ml}$ ;
- m = greutatea eșantionului (g) (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat sau degresat);
- V = total hidrolizat în ml (5.3.4) sau volumul de diluție total calculat pentru extract, în ml (6.1).

Cistina și cisteina se determină amândouă ca acid cistic în hidrolizate de eșantion oxidat, dar se calculează ca cistină ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ , M 240,30 g/mol) folosind M 120,15 g/mol (=  $0,5 \times 240,30$  g/mol).

Metionina se determină ca metionin sulfonă în hidrolizate de eșantion oxidat, dar se calculează ca metionină folosind M pentru metionină: 149,21 g/mol.

**▼ B**

Metionina liberă adăugată se determină după extracție ca metionină, pentru calculare folosindu-se aceeași M.

- 6.1. Volumul total de diluție al extractelor (F) pentru determinarea aminoacizilor liberi (5.2) se calculează după cum urmează:

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

V = volumul extractului final.

7. **Evaluarea metodei**

Metoda a fost testată prin comparații la nivel internațional în 1990 utilizând patru furaje diferite (furaj mixt pentru porc, mixtură pentru pui de carne, concentrat proteic, premixuri). Rezultatele, după eliminarea valorilor extreme, exprimate ca medie și deviație standard sunt prezentate în tabelele de la acest punct:

**Medii în g/kg**

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaj mixt pentru porci	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Compoziție pentru pui de carne	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrat proteic	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premixuri	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = număr de laboratoare participante.

7.1. *Repetabilitate*

Repetabilitatea exprimată ca „deviație standard intra-laborator” a comparației între laboratoare menționată mai sus este redată în tabelele de mai jos:

**Deviația standard intra-laborator ( $S_r$ ) în g/kg**

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaj mixt pentru porci	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Compoziție pentru pui de carne	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrat proteic	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premixuri	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = număr de laboratoare participante.

## ▼B

**Coefficient de variație (%) al deviației standard intra-laborator ( $S_r$ )**

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaj mixt pentru porci	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Compoziție pentru pui de carne	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrat proteic	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premixuri	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = număr de laboratoare participante.

7.2 *Reproductibilitate*

Rezultatele pentru deviația standard inter-laboratoare pentru comparația între laboratoare menționată mai sus sunt prezentate în tabelul de mai jos:

**Deviația standard inter-laboratoare ( $S_R$ ) în g/kg**

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaj mixt pentru porci	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Compoziție pentru pui de carne	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrat proteic	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premixuri	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = număr de laboratoare participante.

**Coefficient de variație (%) al deviației standard inter-laboratoare ( $S_R$ )**

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaj mixt pentru porc	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Compoziție pentru pui de carne	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrat proteic	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premixuri	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = număr de laboratoare participante.



**▼B****8. Utilizarea materialelor de referință**

Aplicarea corectă a metodei se verifică prin repetarea măsurătorilor pentru materialele de referință certificate, atunci când acestea sunt disponibile. Se recomandă calibrarea cu soluție de calibrare pentru aminoacid certificată.

**9. Observații**

- 9.1. Din cauza diferențelor dintre analizorii de aminoacizi, concentrațiile finale ale soluțiilor de calibrare pentru aminoacizii standard (a se vedea 3.27.4 și 3.27.5) și pentru hidrolizat (vezi 5.3.4) se consideră orientative.

Intervalul răspunsului liniar al aparatului trebuie verificat pentru toți aminoacizii.

Soluția etalon se diluează cu soluție tampon de citrat pentru a genera arii de vârf situate la mijlocul intervalului.

- 9.2. În cazul în care pentru analizarea hidrolizatelor se folosește aparatură de cromatografie lichidă de înaltă performanță, condițiile experimentale trebuie optimizate în conformitate cu recomandările fabricantului.
- 9.3. Prin aplicarea metodei la furajele care conțin peste 1 % clorură (concentrat, furaje minerale, furaje suplimentare) poate apărea o subestimare a metioninei, ceea ce necesită un tratament special.

**G. DETERMINAREA TRIPTOFANULUI****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea în furaje a triptofanului total și liber. Ea nu face distincție între formele D și L.

**2. Principiu**

Pentru determinarea triptofanului total, eșantionul se hidrolizează în mediu bazic cu o soluție de hidroxid de bariu saturată și se încălzește la 110 °C timp de 20 de ore. După hidroliză, se adaugă etalon intern.

Pentru determinarea triptofanului liber, eșantionul se extrage în mediu ușor acid în prezența etalonului intern.

Triptofanul și etalonul intern din hidrolizat sau din extract se determină prin HPLC prin detectarea fluorescenței.

**3. Reactivi**

- 3.1. Se utilizează apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS/cm).
- 3.2. Substanță etalon: triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.
- 3.3. Substanță etalon intern: α-metil-triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.
- 3.4. Hidroxid de bariu octahidratat (se evită expunerea excesivă la aer a Ba(OH)<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O pentru a se evita formarea de BaCO<sub>3</sub>, care ar putea perturba determinarea) (a se vedea observația de la punctul 9.3).
- 3.5. Hidroxid de sodiu.
- 3.6. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 %.
- 3.7. Acid clorhidric, ρ<sub>20</sub> 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, de calitate HPLC.
- 3.9. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.

**▼ B**

- 3.10. Soluție de hidroxid de sodiu,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
Se dizolvă 40 g de NaOH (3.5) în apă și se completează până la 1 litru cu apă (3.1).
- 3.11. Acid clorhidric,  $c = 6 \text{ mol/l}$ :  
Se iau 492 ml HCl (3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.
- 3.12. Acid clorhidric,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
Se iau 82 ml HCl (3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.
- 3.13. Acid clorhidric,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ :  
Se iau 8,2 ml HCl (3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.
- 3.14. Acid ortofosforic,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ :  
Se iau 34 ml de acid ortofosforic (3.6) și se completează până la 1 litru cu apă (3.1).
- 3.15. Soluție concentrată de triptofan (3.2),  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2553 g de triptofan (3.2) în acid clorhidric (3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (3.13). Se păstrează la  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  timp de maximum 4 săptămâni.
- 3.16. Soluție de etalon intern concentrată,  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2728 g de  $\alpha$ -metil-triptofan (3.3) în acid clorhidric (3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (3.13). Se păstrează la  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  timp de maximum 4 săptămâni.
- 3.17. Soluție etalon de calibrare pentru triptofan și etalon intern:  
Se iau 2 ml din soluția concentrată de triptofan (3.15) și 2 ml din soluția concentrată de etalon intern ( $\alpha$ -metil-triptofan) (3.16). Se diluează cu apă (3.1) și metanol (3.8) până se ajunge la un volum aproximativ egal și la aproximativ aceeași concentrație de metanol (10-30 %) ca și hidrolizatul final.  
Această soluție trebuie proaspăt preparată înainte de fiecare utilizare.  
În timpul preparării se protejează de lumina solară directă.
- 3.18. Acid acetic.
- 3.19. 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamină g (g/g) > 98 %.
- 3.21. 1 g de soluție de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (3.19) în 100 ml de metanol (3.8).
- 3.22. Fază mobilă pentru HPLC: 3 g de acid acetic (3.18) + 900 ml apă (3.1) + 50 ml soluție (3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (3.19) în metanol (3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5 cu ajutorul etanolaminei (3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (3.1).
4. **Aparatură**
- 4.1. Echipament de HPLC cu detector spectrofluorometric.
- 4.2. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , particule de 3  $\mu\text{m}$  sau echivalent.
- 4.3. pH-metru.
- 4.4. Vas de polipropilenă, cu capacitate de 125 ml, cu gât larg și dop filetat.

**▼ B**

- 4.5. Filtru cu membrană, 0,45 µm.
- 4.6. Autoclavă, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Agitator mecanic sau amestecător magnetic.
- 4.8. Mixer Vortex.

**5. Procedură****5.1. Prepararea eşantioanelor**

Eşantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eşantioanele cu un conţinut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Înainte de măcinare, eşantioanele cu un conţinut ridicat de substanţe grase se extrag cu eter de petrol (3.9).

**5.2. Determinarea triptofanului liber (extract)**

Se cântăreşte cu o abatere de 1 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eşantionul preparat (5.1) într-un flacon tip Erlenmeyer. Se adaugă 100 ml de acid clorhidric (3.13) şi 5 ml din soluţia etalon intern concentrată (3.16). Se agită sau se amestecă timp de 60 minute cu ajutorul unui agitator mecanic sau al unui amestecător magnetic (4.7). Se lasă să se decanteze sedimentul şi se pipetează 10 ml din soluţia supernatantă într-un pahar de laborator. Se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (3.14). Se ajustează pH-ul la valoarea 3 utilizând hidroxid de sodiu (3.10). Se adaugă suficient metanol (3.8) pentru a obţine o concentraţie de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător şi se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ acelaşi volum ca şi soluţia etalon de calibrare (3.17).

Se filtrează câţiva ml de soluţie printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 µm (4.5) înainte de a se injecta în coloana de HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Soluţia etalon şi extractele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea extractelor nu este posibilă în aceeaşi zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile.

**5.3. Determinarea triptofanului total (hidrolizat)**

Se cântăreşte cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 şi 1 g din eşantionul preparat (5.1) într-un vas de polipropilenă (4.4). Porţia de eşantion cântărit are un conţinut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă 8,4 g de hidroxid de bariu octahidrat (3.4) şi 10 ml de apă. Se amestecă într-un mixer Vortex (4.8) sau într-un amestecător magnetic (4.7). Magnetul învelit în teflon se lasă în amestec. Se spală pereţii vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul filetat şi se închide vasul neermetic. Se transferă într-o autoclavă (4.6) cu apă clocotită şi se expun la vapori de apă timp de 30-60 minute. Se închide autoclava şi se autoclavează la 110 (± 2) °C timp de 20 de ore.

Înainte de a deschide autoclava se reduce temperatura la o valoare imediat sub 100 °C. Pentru a se evita cristalizarea Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, se adaugă la amestecul cald 30 ml apă la temperatura camerei. Se agită sau se amestecă uşor. Se adaugă 2 ml din soluţia concentrată de etalon intern (α-metil-triptofan) (3.16). Se răcesc vasele într-o baie de apă/gheaţă timp de 15 minute.

Apoi, se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (3.14). Se menţine vasul în baia de răcire şi se neutralizează cu HCl (3.11) amestecând continuu, apoi se ajustează pH-ul la valoarea 3 utilizând HCl (3.12). Se adaugă suficient metanol pentru a obţine o concentraţie de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător şi se diluează cu apă până la volumul definit necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu provoacă precipitare.

**▼ B**

Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Soluția etalon și hidrolizatele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea hidrolizatelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile.

5.4. *Determinarea prin HPLC*

Următoarele condiții pentru eluția izocratică sunt oferite în scop orientativ; se pot aplica alte condiții cu condiția ca acestea să determine rezultate echivalente (a se vedea, de asemenea, observațiile de la punctele 9.1 și 9.2):

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.2):	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particule de 3 μm sau echivalent
Temperatura coloanei:	Temperatura camerei
Faza mobilă (3.22):	3 g acetic acid (3.18) + 900 ml apă (3.1) + 50 ml soluție (3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (3.19) în metanol (3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5 utilizând etanolamină (3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (3.1)
Rata fluxului:	1 ml/minut
Timpu total de desfășurare:	aproximativ 34 min
Lungimea unde de detecție:	excitare: 280 nm, emisie: 356 nm.
Volum de injecție	20 μl

6. **Calculul rezultatelor**

Se calculează cantitatea de triptofan (X), în g per 100 g de eșantion.

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

A = aria vârfului etalonului intern, soluția etalon de calibrare (3.17);  
B = suprafața vârfului pentru triptofan, extract (5.2) sau hidrolizat (5.3);

V<sub>1</sub> = volumul în ml (2 ml) al soluției concentrate de triptofan (3.15) adăugată la soluția de calibrare (3.17);

c = concentrația în μmol/ml (= 2,50) a soluției concentrate de triptofan (3.15) adăugată la soluția de calibrare (3.17);

V<sub>2</sub> = volumul în ml al soluției etalon intern concentrate (3.16) adăugată la extract (5.2) (= 5 ml) sau la hidrolizat (5.3) (= 2 ml);

C = aria vârfului etalonului intern, extract (5.2) sau hidrolizat (5.3);

D = aria vârfului pentru triptofan, soluția etalon de calibrare (3.17);

V<sub>3</sub> = volumul în ml (= 2 ml) al soluției de etalon intern concentrate (3.16) adăugată la soluția etalon de calibrare (3.17);

m = greutatea eșantionului în g (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat și/sau degresat);

M = masa molară a triptofanului (= 204,23 g/mol).

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 10 % din rezultatul cel mai mare.

**▼B****8. Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a efectuat un studiu comunitar colaborativ (a 4-a comparație între laboratoare) în care au fost analizate trei eșantioane de către 12 laboratoare pentru a certifica metoda de hidroliză. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul următor:

	Eșantion 1 Furaje pentru porci	Eșantion 2 Furaje pentru porci suplimentate cu L-triptofan	Eșantion 3 Furaje concentrate pentru porci
L	12	12	12
n	50	55	50
Medie (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 = numărul de laboratoare care au transmis rezultate;  
n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme);  
 $s_r$  = devierea standard a repetabilității;  
 $S_R$  = devierea standard a reproductibilității;  
 $r$  = repetabilitate;  
 $R$  = reproductibilitate;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație al repetabilității, %;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație al reproductibilității, %.

S-a efectuat un alt studiu comunitar colaborativ (a 3-a comparație între laboratoare) în care au fost analizate două eșantioane de către 13 laboratoare pentru a certifica metoda de extracție a triptofanului liber. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul următor:

	Eșantion 4 Amestec de grâu cu soia	Eșantion 5 Amestec de grâu cu soia (= eșantion 4) adăugat cu triptofan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Medie (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 = numărul de laboratoare care au transmis rezultate;  
n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme);  
 $s_r$  = devierea standard a repetabilității;  
 $S_R$  = devierea standard a reproductibilității;  
 $r$  = repetabilitate;  
 $R$  = reproductibilitate;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație al repetabilității, %;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație al reproductibilității, %.

**▼B**

S-a efectuat un alt studiu comunitar de comparație între laboratoare în care au fost analizate patru eșantioane de către 7 laboratoare cu scopul de a certifica metoda de hidroliză pentru triptofan. Rezultatele sunt prezentate mai jos. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize.

	Eșantion 1 Furaje mixte pentru porci (CRM 117)	Eșantion 2 Făină de pește cu conținut mic de grăsimi (CRM 118)	Eșantion 3 Făină din soia (CRM 119)	Eșantion 4 Lapte praf degresat (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Medie (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 = numărul de laboratoare care au transmis rezultate;  
n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme);  
 $s_r$  = devierea standard a repetabilității;  
 $S_R$  = devierea standard a reproductibilității;  
r = repetabilitate;  
R = reproductibilitate;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație al repetabilității, %;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație al reproductibilității, %.

## 9. Observații

- 9.1. Respectarea următoarelor condiții speciale de cromatografie poate conduce la o mai bună separare a triptofanului de  $\alpha$ -metil-triptofan.

Eluție izocratică urmată de curățarea coloanei prin gradient:

Coloană pentru cromatografie lichidă: 125 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 5 μm sau echivalent  
Temperatura coloanei: 32 °C  
Faza mobilă: A: 0,01 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/metanol, 95 + 5 (V + V).  
B: Metanol  
Programul gradientului:

0 minute	100 % A	0 % B
15 minute	100 % A	0 % B
17 minute	60 % A	40 % B
19 minute	60 % A	40 % B
21 minute	100 % A	0 % B
33 minute	100 % A	0 % B

Rata fluxului: 1,2 ml/minut  
Timpul total de desfășurare: aproximativ 33 minute.

- 9.2. Cromatografia variază în funcție de tipul de HPLC și de materialul utilizat la umplerea coloanei. Sistemul ales trebuie să fie capabil să stabilească o separare inițială de referință între triptofan și etalonul intern. În plus, este important ca produșii de degradare să fie bine

**▼B**

separați de triptofan și de etalonul intern. Se efectuează o operație de probă pe hidrolizate fără etalon intern pentru a verifica prezența impurităților la nivelul liniei de bază corespunzătoare etalonului intern. Este important ca durata eluției pentru toți produșii de degradare să fie suficient de lungă, altfel prezența unor vârfuri de eluție întârziate poate interfera cu operațiile ulterioare de cromatografie.

În cursul operațiilor, sistemul cromatografic oferă un răspuns linear. Acest răspuns linear se măsoară în condiții de concentrație constantă (normalul) a etalonului intern și de concentrații variabile a triptofanului. Este important că înălțimea vârfurilor pentru triptofan și pentru etalonul intern să se situeze în gama lineară a sistemului HPLC/fluorescență. Dacă vârfurile pentru triptofan și/sau pentru etalonul intern sunt prea joase sau prea înalte, analiza se repetă cu un eșantion de o altă dimensiune și/sau un volum final modificat.

9.3. *Hidroxid de bariu*

Cu timpul, hidroxidul de bariu devine mai dificil de dizolvat. Aceasta generează o soluție lipsită de limpezime pentru determinarea HPLC, ceea ce poate duce la rezultate slabe pentru triptofan.

## H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ULEIURI ȘI GRĂSIMI BRUTE

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este destinată determinării în furaje a conținutului de uleiuri și grăsimi brute. Ea nu este aplicabilă analizării semințelor și fructelor oleaginoase.

Utilizarea celor două proceduri descrise mai jos depinde de natura și compoziția furajului și de motivul efectuării analizei.

1.1. *Procedura A – Uleiuri și grăsimi brute care pot fi extrase direct*

Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine vegetală, cu excepția celor incluse în sfera de aplicare a procedurii B.

1.2. *Procedura B – Uleiuri și grăsimi brute totale*

Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine animală și tuturor furajelor combinate. Ea trebuie folosită pentru toate materiile din care uleiurile și grăsimile nu pot fi extrase complet fără hidroliză prealabilă (de exemplu, gluten, drojdie, proteine din cartofi și produse supuse unor procese cum ar fi extrudarea, transformarea în fulgi și încălzirea).

1.3. *Interpretarea rezultatelor*

În toate cazurile în care se obține un rezultat superior folosind procedura B comparativ cu cel obținut prin folosirea procedurii A, rezultatul obținut prin procedura B se acceptă ca valoarea reală.

2. **Principiu**2.1. *Procedura A*

Eșantionul se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin distilare, iar reziduul se usucă și se cântărește.

2.2. *Procedura B*

Eșantionul se tratează la cald cu acid clorhidric. Amestecul se răcește și se filtrează. Reziduul se spală și se usucă, apoi se supune determinării în conformitate cu procedura A.

**▼B****3. Reactivi**

- 3.1. Eter de petrol, interval de fierbere: 40-60 °C. Indicele de brom trebuie să fie mai mic de 1, iar reziduul după evaporare sub 2 mg/100 ml.
- 3.2. Sulfat de sodiu, anhidru.
- 3.3. Acid clorhidric,  $c = 3 \text{ mol/l}$ .
- 3.4. Agent de filtrare, de exemplu Kieselguhr, Hyflo-supercel.

**4. Aparatură**

- 4.1. Aparat de extracție. Dacă este dotat cu un sifon (aparatură Soxhlet), rata refluxului este astfel încât să producă aproximativ 10 cicluri pe oră; dacă aparatul este de tip fără sifon, rata refluxului este de aproximativ 10 ml pe minut.
- 4.2. Cartușe de extracție, lipsite de materie solubilă în eter de petrol și cu o porozitate compatibilă cu cerințele de la punctul 4.1.
- 4.3. Cuptor de uscare, fie cu vid reglat la  $75 \pm 3 \text{ °C}$ , fie cu aer reglat la  $100 \pm 3 \text{ °C}$ .

**5. Procedură****5.1. Procedura A (a se vedea punctul 8.1)**

Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, se transferă într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi.

Cartușul se introduce într-un extractor (4.1) și se extrage timp de șase ore cu eter de petrol (3.1). Se colectează extractul de eter de petrol într-un vas uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce<sup>(1)</sup>.

Solventul se îndepărtează prin distilare. Se usucă reziduul, păstrând vasul timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare (4.3). Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 minute pentru a asigura că greutatea uleiurilor și grăsimilor rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg).

**5.2. Procedura B**

Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (a se vedea punctul 8.2), se introduc într-un pahar de laborator de 400 ml sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric (3.3) și fragmente de piatră ponce. Se acoperă paharul de laborator cu o sticlă de ceas sau se conectează un condensator cu reflux la flaconul tip Erlenmeyer. Se aduce amestecul la fierbere ușoară deasupra unei flăcări mici sau pe o plită și se păstrează în această stare timp de o oră. Trebuie să se împiedice lipirea produsului de părțile laterale ale recipientului.

Se răcește și se adaugă o cantitate de adjuvant de filtrare (3.4) suficientă pentru a evita orice pierdere de ulei și grăsime în timpul filtrării. Se filtrează printr-un filtru de hârtie dublă, umezită și lipsită de grăsimi. Se spală reziduul în apă rece până se obține un filtrat neutru. Se verifică filtratul ca să nu conțină deloc uleiuri și grăsimi. Prezența acestora indică faptul că eșantionul trebuie extras cu eter de petrol, folosind procedura A, înainte de hidroliză.

Se așează filtrul de hârtie dublă care conține reziduul pe o sticlă de ceas și se usucă timp de o oră și jumătate în cuptorul cu aer (4.3) la  $100 \pm 3 \text{ °C}$ .

<sup>(1)</sup> În cazul în care uleiurile sau grăsimile trebuie supuse unor teste de calitate ulterioare, fragmentele de piatră ponce se înlocuiesc cu mărgelile de sticlă.



**▼B**

Se așează filtrul de hârtie dublă care conține reziduul uscat într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartușul se introduce într-un extractor (4.1) și se procedează astfel cum se indică la paragrafele doi și trei de la punctul 5.1.

**6. Exprimarea rezultatului**

Greutatea reziduului se exprimă ca procent din eșantion.

**7. Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de același laborant nu depășesc:

— 0,2 % în valoare absolută, pentru un conținut în uleiuri și grăsimi brute mai mic de 5 %;

— 4 % relativ la rezultatul cel mai mare pentru un conținut cuprins între 5 și 10 %;

— 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut mai mare de 10 %.

**8. Observații**

- 8.1. Pentru produse cu un conținut mare de uleiuri și grăsimi, care sunt dificil de măcinat sau care sunt improprii prelevării unui eșantion de testare redus omogen, se procedează după cum urmează.

Se cântăresc 20 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se amestecă cu o cantitate de 10 g sau mai mare de sulfat de sodiu anhidru (3.2). Se extrage cu eter de petrol (3.1) astfel cum se indică la punctul 5.1. Se completează extractul obținut până la 500 ml cu eter de petrol (3.1) și se amestecă. Se iau 50 ml de soluție și se introduc într-un vas mic, uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce. Se elimină solvenții prin distilare, se usucă și se procedează astfel cum se indică la ultimul paragraf al punctului 5.1.

Se elimină solvenții din reziduul de extracție rămas în cartuș, se macină reziduul până la o finețe de 1 mm, se reintroduce în cartușul de extracție (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se procedează astfel cum se indică la punctul 5.1, paragrafele doi și trei.

Conținutul de uleiuri și grăsimi se calculează ca procent din eșantion folosind următoarea formulă:

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

unde:

$m_1$  = greutatea în grame a reziduului după prima extracție (parte alicotă din extract);

$m_2$  = greutatea în grame a reziduului după a doua extracție.

- 8.2. Pentru produsele cu conținut mic de uleiuri și grăsimi, masa eșantionului de testat se poate mări la 5 g.
- 8.3. Este posibil ca, înainte de hidroliză și extracție, hrana pentru animalele de companie cu conținut mare de apă să trebuiască să fie amestecată cu sulfat de sodiu anhidru, conform procedurii B.
- 8.4. La punctul 5.2, poate fi mai eficientă folosirea apei calde în locul apei reci pentru spălarea reziduului după filtrare.
- 8.5. Este posibil ca timpul de uscare de 1,5 h să necesite a fi prelungit pentru unele furaje. Uscarea excesivă se evită, întrucât acest fapt poate determina rezultate slabe. Se poate folosi, de asemenea, un cuptor cu microunde.

**▼B**

- 8.6. Preextraction prin procedura A înainte de hidroliză și de reextraction prin procedura B se recomandă în cazul în care conținutul de uleiuri/grăsimi brute este mai mare de 15 %. Într-o anumită măsură, acest fapt depinde de natura furajului și de natura uleiurilor/grăsimeilor din furaj.

**I. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE FIBRE BRUTE****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în furaje a substanțelor organice lipsite de grăsimi care sunt insolubile în mediu acid și alcalin și care sunt descrise în mod convențional ca fibre brute.

**2. Principiu**

Eșantionul, degresat la nevoie, se tratează succesiv cu soluții de acid sulfuric și hidroxid de potasiu, de concentrații specifice, în stare de fierbere. Reziduul se separă prin filtrare printr-un filtru de sticlă sinterizată spălat, uscat, cântărit și calcinat la o temperatură cuprinsă între 475 și 500 °C. Pierderea de greutate rezultată prin calcinare corespunde fibrelor brute din eşantionul testat.

**3. Reactivi**

- 3.1. Acid sulfuric,  $c = 0,13 \text{ mol/l}$ .
- 3.2. Agent antispumant (de exemplu n-octanol).
- 3.3. Agent de filtrare (Celite 545 sau echivalent), încălzit la 500 °C timp de patru ore (8.6).
- 3.4. Acetonă.
- 3.5. Eter de petrol cu interval de fierbere între 40 și 60 °C.
- 3.6. Acid clorhidric,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Soluție de hidroxid de potasiu,  $c = 0,23 \text{ mol/l}$ .

**4. Aparatură**

- 4.1. Unitate de încălzire pentru dizolvare cu acid sulfuric și soluție de hidroxid de potasiu, echipată cu un suport pentru creuzetul filtrant (4.2) și dotată cu un tub de evacuare prevăzut cu un dop la orificiul de ieșire pentru lichide și de creare de vid, posibil și cu aer comprimat. Înainte de fiecare utilizare zilnică, unitatea se preîncălzește cu apă aflată în stare de fierbere, timp de 5 minute.
- 4.2. Creuzet filtrant de sticlă cu placă filtrantă de sticlă sinterizată fuzionată, cu pori de 40-90 μm. Înainte de prima utilizare se încălzește la 500 °C timp de câteva minute, iar apoi se răcește (8.6).
- 4.3. Cilindru de cel puțin 270 ml cu condensator cu reflux, care poate fi supus fierberii.
- 4.4. Cuptor de uscare, cu termostat.
- 4.5. Cuptor cu muflă, cu termostat.
- 4.6. Unitate de extracție compusă dintr-o placă de sprijin pentru creuzetul filtrant (4.2) și cu o țevă de evacuare prevăzută cu un dop la orificiul de creare de vid și de ieșire a lichidelor.
- 4.7. Inele de conectare utilizate pentru a asambla unitatea de încălzire (4.1), creuzetul (4.2) și cilindrul (4.3), precum și pentru a conecta unitatea de extracție la rece (4.6) cu creuzetul.

**5. Procedură**

Se cântărește 1 g de eşantion preparat cu o abatere de 1 mg și se introduce în creuzet (4.2), (a se vedea observațiile 8.1, 8.2 și 8.3) și se adaugă 1 g de adjuvant de filtrare (3.3).

**▼B**

Se assemblează unitatea de încălzire (4.1) și creuzetul filtrant (4.2), apoi se atașează cilindrul (4.3) la creuzet. Se toarnă 150 ml de acid sulfuric aflat în stare de fierbere (3.1) în ansamblul cilindru-creuzet și, dacă este necesar, se adaugă câteva picături de agent antispumant (3.2).

Se aduce lichidul la fierbere în decurs de  $5 \pm 2$  minute și se fierbe viguros exact 30 de minute.

Se deschide dopul țevii de evacuare (4.1) și, în condiții de vid, se filtrează acidul sulfuric prin creuzetul filtrant, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de 30 ml de apă aflată în stare de fierbere, asigurându-se că reziduul se filtrează uscat după fiecare spălare.

Se închide dopul orificiului de evacuare și se toarnă 150 ml de soluție de hidroxid de potasiu aflată în stare de fierbere (3.7) în ansamblul cilindru-creuzet, apoi se adaugă câteva picături de agent antispumant (3.2). Se aduce lichidul la punctul de fierbere în decurs de  $5 \pm 2$  minute și se fierbe viguros exact 30 de minute. Se filtrează și se repetă procedura de spălare utilizată în etapa cu acid sulfuric.

După spălarea și uscarea finală, se deconectează creuzetul împreună cu conținutul său și se reconectează la unitatea de extracție la rece (4.6). Se creează vidul, iar reziduul se spală în creuzet cu trei porții consecutive de acetonă de 25 ml (3.4), asigurându-se că reziduul se filtrează în starea uscată după fiecare spălare.

Creuzetul se usucă în cuptor la 130 °C până se ajunge la o greutate constantă. După fiecare uscare, se răcește în desicator și se cântărește rapid. Se introduce creuzetul într-un cuptor cu muflă și se calcinează până se atinge o greutate constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 2 mg) la o temperatură cuprinsă între 475 °C și 500 °C timp de cel puțin 30 de minute.

După fiecare încălzire, înainte de cântărire se răcește mai întâi în cuptor, iar apoi în desicator.

Se efectuează un test martor fără eșantion. Pierderea de greutate rezultată din calcinare nu trebuie să depășească 4 mg.

## 6. Calculul rezultatelor

Conținutul de fibre brute exprimat ca procent din eșantion este dat de formula:

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

unde:

$m$  = greutatea eșantionului în g;

$m_0$  = pierderea de greutate după calcinare în cursul determinării, în g;

$m_1$  = pierderea de greutate după calcinare în cursul testului martor, în g.

## 7. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 0,6 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;

— 6 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

## 8. Observații

- 8.1. Furajele care au conținut de grăsimi brute mai mare de 10 % trebuie să fie degresate înainte de a fi supuse analizei cu eter de petrol (3.5). Creuzetul filtrant (4.2) împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (4.6) și se creează vidul, apoi se spală

**▼B**

reziduul cu trei porții consecutive de eter de petrol de 30 ml, asigurându-se că reziduul este uscat. Creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de încălzire (4.1) și se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.

- 8.2. Furajele care conțin grăsimi care nu pot fi extrase direct cu eter de petrol (3.5) trebuie degresate astfel cum se indică la punctul 8.1 și degresate încă o dată după fierbere cu acid. După fierbere cu acid și spălare consecutivă, creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (4.6), apoi se spală de trei ori cu 30 ml acetonă, urmat de trei spălări suplimentare cu porții de eter de petrol de 30 ml. Se filtrează sub vid până la uscare, iar analizarea se continuă astfel cum se descrie la punctul 5, începând cu tratamentul cu hidroxid de potasiu.
- 8.3. Dacă furajul conține mai mult de 5 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu, se conectează creuzetul (4.2) împreună cu eșantionul cântărit la unitatea de încălzire (4.1). Eșantionul se spală de trei ori cu 30 ml acid clorhidric (3.6). După fiecare adăugare, se lasă eșantionul să stea timp de aproximativ 1 minut înainte de filtrare. Se spală o singură dată cu 30 ml apă, iar apoi se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.
- 8.4. Dacă se utilizează aparatură în formă de stativ (o serie de creuzete atașate la aceeași unitate de încălzire) nu se efectuează două determinări individuale pe același eșantion de analizat în aceeași serie.
- 8.5. Dacă după fierbere este dificil să se filtreze soluțiile acide și alcaline, se utilizează aer comprimat introdus prin țeava de evacuare a unității de încălzire și apoi se continuă filtrarea.
- 8.6. Temperatura de calcinare nu depășește 500 °C pentru a se putea prelungi timpul de utilizare a sticlei creuzetului filtrant. Trebuie acordată atenție pentru a se evita șocurile termice excesive în cursul ciclurilor de încălzire și răcire.

**J. DETERMINAREA ZAHARURILOR****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea cantității de zaharuri reductoare și a zaharurilor totale după inversie, exprimate ca glucoză sau, acolo unde este cazul, ca zaharoză, prin conversie cu factorul 0,95. Ea este aplicabilă furajelor combinate. Pentru alte tipuri de furaje există metode specifice. Dacă este necesar, lactoza se determină separat, ținându-se cont de aceasta la calcularea rezultatelor.

**2. Principiu**

Zaharurile se extrag în etanol diluat; soluția se limpezește cu soluția Carrez I și II. După eliminarea etanolului, cantitățile pre- și post-inversie se determină prin metoda Luff-Schoorl.

**3. Reactivi**

- 3.1. Soluție de etanol cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C, neutralizată cu fenolftaleină.
- 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.4. Metiloranj, soluție 0,1 % (greutate/volum).
- 3.5. Acid clorhidric 4 mol/litru.
- 3.6. Acid clorhidric 0,1 mol/litru.

**▼B**

- 3.7. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru.
- 3.8. Reactiv Luff-Schoorl:  
 Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (3.8.2) în soluția de carbonat de sodiu (3.8.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (3.8.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează.  
 Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/litru), a se vedea (5.4) ultimul paragraf. ph-ul soluției este aproximativ 9,4.
- 3.8.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, lipsită de fier, în 100 ml de apă.
- 3.8.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O, în 50 ml de apă.
- 3.8.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească.
- 3.9. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.
- 3.10. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la un litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare.
- 3.11. Acid sulfuric 3 mol/litru.
- 3.12. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum).
- 3.13. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate.
- 3.14. 3-metilbutan-1-ol.
4. **Aparatură**  
 Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.
5. **Procedură**
- 5.1. *Extracția eșantionului*  
 Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 200 ml etanol (3.1) și se amestecă timp de o oră în agitator. Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (3.2) și se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde. Se adaugă aproximativ 5 ml de soluție Carrez II (3.3) și se amestecă din nou timp de un minut. Se completează până la volum cu etanolul (3.1), se omogenizează și se filtrează. Se îndepărtează 200 ml de filtrat și se evaporă până la aproximativ jumătate din volum în scopul eliminării majorității etanolului. Reziuul rămas după evaporare se transferă cantitativ într-un balon gradat de 200 ml cu ajutorul apei calde, se răcește, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și, dacă este necesar, se filtrează. Această soluție se va utiliza pentru determinarea cantității zaharurilor reductoare și, după inversie, a zaharurilor totale.
- 5.2. *Determinarea zaharurilor reductoare*  
 Cu ajutorul unei pipete se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă sub formă de conținut procentual de glucoză în eșantion.
- 5.3. *Determinarea zaharurilor totale după inversie*  
 Cu ajutorul unei pipete se recoltează 50 ml de soluție și se transferă într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă câteva picături de soluție de metiloranj (3.4), apoi, amestecând continuu, se adaugă cu grijă acid clorhidric (3.5) până când lichidul virează într-un roșu bine definit. Se adaugă 15 ml de acid clorhidric (3.6), se scufundă balonul într-o baie de

**▼B**

apă clocotindă și se menține acolo timp de 30 de minute. Se răcește rapid la aproximativ 20 °C și se adaugă 15 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.7). Se completează cu apă până la 100 ml și se omogenizează. Se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 de ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă în procente de glucoză sau, dacă este cazul, de zaharoză, prin multiplicare cu factorul 0,95.

**5.4. Titrare prin metoda Luff-Schoorl**

Cu ajutorul unei pipete se recoltează 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (3.8) și se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml; se adaugă exact 25 ml din soluția de zaharuri limpezită. Se adaugă 2 granule de piatră ponce (3.13), se încălzește, amestecând manual, deasupra unei flăcări libere cu înălțime medie, aducându-se lichidul la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așează imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacăra aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact zece minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează:

Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (3.12) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml de acid sulfuric (3.11). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (3.9) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (3.10) și încheind titrarea.

Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (3.8) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (3.12) și 25 ml de acid sulfuric (3.11), fără a se fierbe.

**6. Calculul rezultatelor**

Utilizând tabelul, se stabilește cantitatea de glucoză în mg care corespunde diferenței dintre valorile celor două titrări, exprimate în mg de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatele se exprimă ca procent din eșantion.

**7. Proceduri speciale**

- 7.1. În cazul furajelor bogate în melase și al altor furaje care nu sunt în mod particular omogene, se cântăresc 20 g și se introduc, împreună cu 500 ml de apă, într-un balon gradat de 1 litru. Se amestecă timp de o oră în agitator. Se limpezește cu ajutorul reactivilor Carrez I (3.2) și II (3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1, utilizând, de data aceasta, o cantitate de patru ori mai mare din fiecare reactiv. Se completează până la volum cu etanol 80 % (v/v).

Se omogenizează și se filtrează. Se elimină etanolul astfel cum se descrie la punctul 5.1. În absența amidonului dextrinizat, se completează până la volum cu apă distilată.

- 7.2. În cazul melaselor și al materiilor prime pentru furaje bogate în zaharuri și cvasi lipsite de amidon (roșcove, fulgi de rădăcină de sfeclă uscați etc.), se cântăresc 5 g, se introduc într-un balon gradat de 250 ml, se adaugă 200 ml apă distilată și se amestecă în agitator timp de o oră sau, dacă este necesar, mai mult. Se limpezește cu ajutorul reactivilor Carrez I (3.2) și II (3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1. Se completează până la volum cu apă rece, se omogenizează și se filtrează. Pentru determinarea cantității totale de zaharuri, se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.3.

**8. Observații**

- 8.1. În scopul prevenirii formării de spumă este recomandabil să se adauge (indiferent de volum) aproximativ 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (3.14) înainte de fierbere cu reactiv Luff-Schoorl.

**▼ B**

- 8.2. Diferența dintre conținutul total de zaharuri după inversie exprimat ca glucoză și conținutul de zaharuri reductoare exprimat ca glucoză, multiplicată cu 0,95, reprezintă conținutul procentual de zaharoză.
- 8.3. Pentru a determina conținutul de zaharuri reductoare, cu excepția lactozei, se pot adopta două metode:
- 8.3.1. Pentru un calcul aproximativ, conținutul de lactoză stabilit printr-o metodă de analiză diferită se multiplică cu 0,675, iar rezultatul obținut se scade din conținutul de zaharuri reductoare.
- 8.3.2. Pentru un calcul precis al zaharurilor reductoare, cu excepția lactozei, se utilizează același eșantion în cele două determinări finale. Una dintre analize se efectuează pe o parte din soluția obținută în conformitate cu punctul 5.1, alta pe o parte din soluția obținută în cursul determinării lactozei prin metoda stabilită în acest sens (după fermentarea celorlalte tipuri de zaharuri și limpezire).

În ambele cazuri, cantitatea de zaharuri prezentă se determină prin metoda Luff-Schoorl și se calculează în mg de glucoză. Una dintre valori se scade din cealaltă, iar diferența se exprimă ca procent din eșantion.

*Exemplu*

Cele două volume considerate corespund, pentru fiecare determinare, unui eșantion de 250 mg.

În primul caz, se consumă 17 ml de soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru, ceea ce corespunde la 44,2 mg de glucoză; în al doilea, 11 ml, ceea ce corespunde la 27,6 mg de glucoză.

Diferența este 16,6 mg de glucoză.

Prin urmare, conținutul de zaharuri reductoare (cu excepția lactozei), calculat ca glucoză, este:

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

**Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl**

ml de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,1 mol/litru, două minute încălzire, zece minute fierbere

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/ litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactoză C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltoză C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/ litru
	ml	mg	diferență	mg	diferență	mg	
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****K. DETERMINAREA LACTOZEI****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea conținutului de lactoză în furajele care au un conținut de lactoză mai mare de 0,5 %.

**2. Principiu**

Zaharurile se dizolvă în apă. Soluția este supusă fermentației de către drojdia *Saccharomyces cerevisiae* care nu descompune lactoza. După limpezire și filtrare, conținutul de lactoză al filtratului se determină prin metoda Luff-Schoorl.

**3. Reactivi**

3.1. Suspensie de *Saccharomyces cerevisiae*: se suspendă 25 g de drojdie proaspătă în 100 ml de apă. Suspensia se păstrează în frigider o perioadă de maximum o săptămână.

3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Reactiv Luff-Schoorl:

Amestecând cu grijă, se toarnă soluție de acid citric (3.4.2) în soluția de carbonat de sodiu (3.4.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (3.4.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează. Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru;  $Na_2CO_3$  1 mol/litru). ph-ul soluției este aproximativ 9,4.

3.4.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 de g de sulfat de cupru,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , lipsită de fier, în 100 ml apă.

3.4.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 de g de acid citric,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , în 50 ml de apă.

3.4.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească.

3.5. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate.

3.6. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum).

3.7. Acid sulfuric 3 mol/litru.

3.8. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.

3.9. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la un litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare.

**4. Aparatură**

Baie de apă cu termostat reglat la 38-40 °C.

**5. Procedură**

Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduce într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25-30 ml de apă. Balonul se introduce într-o baie de apă aflată la temperatura de fierbere, timp de 30 de minute, apoi se răcește la aproximativ 35 °C. Se adaugă 5 ml de suspensie de drojdie (3.1) și se omogenizează. Balonul se lasă să stea timp de două ore într-o baie de apă la temperatura de 38-40 °C. Se răcește la aproximativ 20 °C.

Se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez I (3.2) și se amestecă timp de treizeci de secunde, apoi se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez II (3.3) și se amestecă din nou timp de treizeci de secunde. Se completează cu apă până la 100 ml, se amestecă și se filtrează. Cu ajutorul unei pipete, se



**▼B**

îndepărtează o cantitate de filtrat care nu depășește 25 ml și care conține, de preferință, 40-80 mg de lactoză, apoi se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml. Dacă este necesar, se completează cu apă până la 25 ml.

Se efectuează un test martor în același mod cu 5 ml de suspensie de drojdie (3.1). Se determină conținutul de lactoză prin metoda Luff-Schoorl, după cum urmează: se adaugă exact 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (3.4) și două granule de piatră ponce (3.5). Se amestecă manual concomitent cu încălzirea deasupra unei flăcări libere de înălțime medie, iar lichidul se aduce la fierbere în aproximativ două minute. Flaconul Erlenmeyer se așează imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flăcără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact zece minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează:

Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (3.6) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml acid sulfuric (3.7). Se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu (3.8) până la apariția unei culori galben șters, se adaugă soluția de amidon (3.9) și se finalizează titrarea.

Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (3.4) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (3.6) și 25 ml de acid sulfuric (3.7), fără a se fierbe.

**6. Calculul rezultatelor**

Utilizând tabelul atașat, se stabilește cantitatea de lactoză în mg care corespunde diferenței dintre rezultatele celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.

Rezultatul pentru lactoza anhidră se exprimă ca procent din eșantion.

**7. Observație**

Pentru produsele care conțin mai mult de 40 % zahăr fermentescibil, se utilizează mai mult de 5 ml de suspensie de drojdie (3.1).

**Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl**

ml de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,1 mol/litru, două minute încălzire, zece minute fierbere

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/ litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lactoză C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltoză C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/ litru
	ml	mg	diferență	mg	diferență	mg	
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**

## L. DETERMINAREA AMIDONULUI

**METODA POLARIMETRICĂ****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de amidon și a produselor de degradare a amidonului cu masă moleculară mare cu scopul de a se verifica conformitatea cu valoarea energetică declarată (prevederile din anexa VII) și cu Directiva 96/25/CE a Consiliului (<sup>1</sup>).

**2. Principiu**

Metoda cuprinde două determinări. În prima, eșantionul este tratat cu acid clorhidric diluat. După limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică a soluției prin polarimetrie.

În cea de-a doua, eșantionul este extras cu etanol 40 %. După acidificarea filtratului cu acid clorhidric, limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică la fel ca în prima determinare.

Diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut, oferă conținutul de amidon al eșantionului.

**3. Reactivi**

3.1. Acid clorhidric, soluție cu concentrație 25 % (g/g): 1,126 g/ml.

3.2. Acid clorhidric, soluție 1,13 % (greutate/volum)

Concentrația se verifică prin titrare folosind o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru în prezența roșului de metil 0,1 % (greutate/volum) în etanol 94 % (v/v). Pentru neutralizarea a 10 ml sunt necesari 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/litru.

3.3. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.5. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C.

**4. Aparatură**

4.1. Flacon Erlenmeyer de 250 ml cu îmbinare de sticlă șlefuită standard și cu condensator cu reflux.

4.2. Polarimetru sau zaharimetru.

**5. Procedură****5.1. Prepararea eșantionului**

Eșantionul se zdrobește până când devine suficient de fin pentru a trece complet printr-o sită cu orificii rotunde de 0,5 mm.

**5.2. Determinarea rotației optice totale (P sau S) (a se vedea observația de la punctul 7.1)**

Se cântăresc 2,5 g din eșantionul zdrobit cu abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (3.2), se agită pentru a obține o distribuție uniformă a eșantionului de testat și se adaugă încă 25 ml de acid clorhidric (3.2). Se scufundă balonul într-o baie de apă care fierbe, agitându-se cu putere

(<sup>1</sup>) JO L 125, 23.5.1996, p. 35.

**▼B**

și în mod constant în primele trei minute pentru a preveni formarea de aglomerări. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere atunci când balonul este introdus în ea. Balonul nu trebuie să fie scos din baie în timp ce este agitat. După exact 15 minute, se scoate din baie, se adaugă 30 ml de apă rece și se răcește imediat la 20 °C.

Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (3.3) și se agită timp de aproximativ 30 de secunde. Apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (3.4) și se agită din nou timp de aproximativ 30 de secunde. Se completează cu apă până la volum, se amestecă și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect limpede (ceea ce se întâmplă rar), se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare din soluțiile Carrez I și II, de exemplu 10 ml.

Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetrul sau cu zaharimetrul.

### 5.3. *Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în etanol 40 %*

Se cântăresc 5 g din eșantion cu abatere de 1 mg, se introduc într-un balon gradat de 100 ml și se adaugă aproximativ 80 ml de etanol (3.5) (a se vedea observația de la punctul 7.2). Se lasă balonul să stea timp de o oră la temperatura camerei; în acest timp, se agită cu putere de șase ori astfel încât eșantionul de testat să se amestece complet cu etanolul. Se completează până la volum cu etanol (3.5), se amestecă și se filtrează.

Se pipetează 50 ml de filtrat (corespunde la 2,5 g de eșantion) într-un flacon Erlenmeyer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (3.1) și se agită puternic. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux, iar vasul se scufundă într-o baie de apă în fierbere. După exact 15 minute, se scoate flaconul Erlenmeyer din baie, se transferă conținutul într-un balon gradat de 100 ml, clătind cu puțină apă rece și se răcește la 20 °C.

Se limpește folosind soluțiile Carrez I (3.3) și II (3.4), se completează până la volum cu apă, se amestecă, se filtrează și se măsoară rotația optică astfel cum se indică la punctul 5.2 paragrafele doi și trei.

## 6. **Calculul rezultatelor**

Conținutul de amidon (%) se calculează după cum urmează:

### 6.1. *Măsurare cu polarimetrul*

$$\text{Conținut de amidon (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = rotația optică totală în grade unghiulare;

P' = rotația optică în grade unghiulare a substanțelor solubile în etanol 40 % (V/V);

$[\alpha]_D^{20^\circ}$  = rotația optică specifică a amidonului pur. Valorile numerice acceptate în mod convențional pentru acest factor sunt următoarele:

+185,9°:	amidon din orez
+185,7°:	amidon din cartofi
+184,6°:	amidon din porumb
+182,7°:	amidon din grâu
+181,5°:	amidon din orz
+181,3°:	amidon din ovăz
+184,0°:	alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon în furaje combinate.

### 6.2. *Măsurare cu zaharimetrul*

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

**▼ B**

- S = rotația optică totală în grade zaharimetrice;  
 S' = rotația optică în grade zaharimetrice a substanțelor solubile în etanol 40 % (v/v);  
 N = greutatea (g) a zaharozei în 100 ml de apă determinând o rotație optică de 100 grade zaharimetrice măsurată cu un tub de 200 mm  
 16,29 g pentru zaharimetrele franceze  
 26 g pentru zaharimetrele germane  
 20 g pentru zaharimetrele mixte;  
 $[\alpha]_D^{20}$  = rotația optică specifică a amidonului pur (a se vedea punctul 6.1).

6.3. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,4 în valoare absolută pentru un conținut de amidon mai mic de 40 % și 1 % în valoare relativă în cazul conținutului de amidon egal sau mai mare de 40 %.

7. **Observații**

7.1. În cazul în care eșantionul conține mai mult de 6 % carbonați, calculați sub formă de carbonat de calciu, aceștia trebuie distruși prin tratare cu o cantitate perfect adecvată de acid sulfuric diluat înaintea determinării rotației optice totale.

7.2. În cazul produselor cu un conținut mare de lactoză, cum ar fi zerul praf sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează după adăugarea a 80 ml etanol (3.5). La balon se fixează un condensator cu reflux, iar balonul se scufundă într-o baie de apă la 50 °C timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza astfel cum se indică la punctul 5.3.

7.3. În cazul în care sunt prezente în cantități semnificative în furaje, următoarele materii prime furajere sunt cunoscute ca dând naștere la interferențe atunci când conținutul de amidon se determină prin metoda polarimetrică și, din acest motiv, se pot obține rezultate incorecte:

- produse din sfeclă (de zahăr), precum pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), vinasă de sfeclă (de zahăr), zahăr (din sfeclă);
- pulpă de citrice;
- semințe de in; șrot de semințe de in; șrot de semințe de in rezultat după extracție;
- semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță rezultat după extracție; coji de semințe de rapiță;
- semințe de floarea soarelui; șrot de semințe de floarea soarelui rezultat după extracție; semințe de floarea soarelui parțial decorticate, rezultate după extracție;
- șrot de copra; șrot de copra rezultat după extracție;
- pulpă de cartofi;
- drojdie deshidratată;
- produse bogate în inulină (de exemplu, fulgi și făină de topinambur);
- jumări.

## M. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CENUȘĂ BRUTĂ

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de cenușă brută.

**▼ B****2. Principiu**

Eșantionul se calcinează la 550 °C; reziduul se cântărește.

**3. Reactivi**

Nitrat de amoniu, soluție 20 % (greutate/volum).

**4. Aparatură****4.1. Plită.****4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat.****4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm).****5. Procedură**

Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (2,5 g pentru produsele cu tendință de umflare) și se introduc într-un creuzet pentru calcinare, care în prealabil a fost încălzit la 550 °C, răcit și tarat. Se așează creuzetul pe plită și se încălzește progresiv până la carbonizarea materialului. Se calcinează în conformitate cu mențiunile de la punctul 5.1 sau 5.2.

**5.1. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se menține la această temperatură până la obținerea unei cenuși albe, gri deschis sau roșiatic, aparent lipsită de particule carbonizate. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat.****5.2. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se calcinează timp de 3 ore. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat. Se calcinează din nou timp de 30 minute pentru a asigura că greutatea cenușii rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg).****6. Calculul rezultatelor**

Greutatea reziduului se calculează prin deducerea tarei.

Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

**7. Observații****7.1. Cenușa *substanțelor dificil de calcinat* trebuie supusă unei calcinări inițiale timp de cel puțin trei ore, urmată de răcire și de adăugarea câtorva picături de soluție de nitrat de amoniu 20 % sau de apă (cu grijă, pentru a evita dispersarea cenușii și formarea de aglomerări). Se continuă calcinarea după uscarea în cuptor. Operația se repetă până când calcinarea este completă.****7.2. În cazul *substanțelor rezistente la tratamentul* descris la punctul 7.1, se procedează în felul următor: după calcinare timp de trei ore, se introduce cenușa în apă caldă și se filtrează printr-un filtru mic, lipsit de cenușă. Filtrul și conținutul său se calcinează în creuzetul inițial. Filtratul se introduce în creuzetul răcit, se evaporă până la uscare, se calcinează și se cântărește.****7.3. În cazul *uleiurilor și grăsimilor*, se cântăresc cu precizie 25 g de eșantion într-un creuzet de dimensiuni adecvate. Se carbonizează prin aprinderea materialului cu ajutorul unei benzi de filtru de hârtie, lipsit de cenușă. După combustie, se umectează cu cât mai puțină apă. Se usucă și se calcinează astfel cum se descrie la punctul 5.**

**▼ B****N. DETERMINAREA CENUȘII INSOLUBILE ÎN ACID CLORHIDRIC****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de substanțe minerale insolubile în acid clorhidric. Se pot utiliza două metode, în funcție de natura eșantionului.

1.1. *Metoda A:* aplicabilă materiilor prime furajere organice furaje și majorității furajelor combinate.

1.2. *Metoda B:* aplicabilă compușilor și amestecurilor minerale, precum furajelor combinate al căror conținut de substanțe insolubile în acid clorhidric, determinat conform metodei A, este mai mare de 1 %.

**2. Principiu**

2.1. *Metoda A:* eșantionul se calcinează, cenușa se fierbe în acid clorhidric, iar reziduul insolubil se filtrează și se cântărește.

2.2. *Metoda B:* eșantionul se tratează cu acid clorhidric. Soluția se filtrează, reziduul se calcinează, iar cenușa astfel obținută se tratează conform metodei A.

**3. Reactivi**

3.1. Acid clorhidric 3 mol/litru.

3.2. Acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum).

3.3. Acid tricloracetic, soluție 1 % (greutate/volum).

**4. Aparatură**

4.1. Plită.

4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat.

4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm).

**5. Procedură**

5.1. *Metoda A:*

Eșantionul se calcinează prin metoda descrisă la determinarea cenușii brute. Se poate utiliza și cenușă obținută din analiza respectivă.

Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (3.1). Se aduce lent la fierbere și se fierbe încet timp de cincisprezece minute. Soluția caldă se filtrează printr-un filtru de hârtie lipsit de cenușă, iar reziduul se spală cu apă caldă până când reacția acidă nu mai este vizibilă. Filtrul care conține reziduul se usucă și se calcinează într-un creuzet tarat, la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se răcește într-un desicator și se cântărește.

5.2. *Metoda B*

Se cântărește 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un pahar de laborator de 250-400 ml. Se adaugă succesiv 25 ml apă și 25 ml acid clorhidric (3.1), se amestecă și se așteaptă ca efervescența să înceteze. Se adaugă încă 50 ml de acid clorhidric (3.1). Se așteaptă ca degajarea de gaz să înceteze, apoi se introduce paharul de laborator într-o baie de apă la temperatura de fierbere și se menține acolo timp de 30

**▼B**

de minute sau, dacă este necesar, mai mult, pentru ca amidonul eventual prezent să se hidrolizeze complet. Se filtrează până este încă cald, printr-un filtru lipsit de cenușă, iar filtrul se spală în 50 ml de apă caldă (a se vedea observația 7). Se introduce filtrul care conține reziduu într-un creuzet pentru calcinare, se usucă și se calcinează la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (3.1); se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.1, al doilea paragraf.

**6. Calculul rezultatelor**

Se calculează greutatea reziduuului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

**7. Observație**

Dacă filtrarea se dovedește dificilă, se reia analiza, înlocuind cei 50 ml de acid clorhidric (3.1) cu 50 ml de acid tricloracetic 20 % (3.2) și spălând filtrul într-o soluție caldă de acid tricloracetic 1 % (3.3).

**O. DETERMINAREA CARBONAȚILOR****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în majoritatea furajelor a cantității de carbonați, exprimați în mod convențional ca și carbonat de calciu.

Totuși, în anumite cazuri (cum ar fi carbonatul de fier), se utilizează o metodă specială.

**2. Principiu**

Carbonații se descompun în acidul clorhidric; dioxidul de carbon eliberat se colectează într-un tub gradat, iar volumul său se compară cu cel eliberat în aceleași condiții de o cantitate cunoscută de carbonat de calciu.

**3. Reactivi**

- 3.1. Acid clorhidric, concentrație 1,10 g/ml.
- 3.2. Carbonat de calciu.
- 3.3. Acid sulfuric, aproximativ 0,05 mol/litru, colorat cu roșu de metil.

**4. Aparatură**

Aparat Scheibler-Dietrich (vezi schema) sau aparatură echivalentă.

**5. Procedură**

În conformitate cu conținutul de carbonați al eșantionului, se cântărește o porție de eșantion conform indicațiilor de mai jos:

- 0,5 g pentru produsele care conțin 50-100 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;
- 1 g pentru produsele care conțin 40-50 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;
- 2-3 g pentru alte produse.

Porția de eșantion se introduce în flaconul special (4) al aparatului, dotat cu un mic tub din material indestructibil care conține 10 ml acid clorhidric (3.1), apoi se conectează flaconul la aparat. Se răsuțește robinetul cu trei căi (5) astfel încât tubul (1) să comunice cu exteriorul. Cu ajutorul tubului mobil (2), care este umplut cu acid sulfuric colorat (3.3) și conectat la tubul gradat (1), se aduce nivelul lichidului la gradația zero. Se răsuțește robinetul (5) astfel încât să se conecteze tuburile (1) și (3) și se verifică nivelul pentru a fi la zero.

Se toarnă lent acidul clorhidric (3.1) peste porția de eșantion, înclinând flaconul (4). Se egalizează presiunea prin coborârea tubului (2). Se agită flaconul (4) până la încetarea completă a eliberării de dioxid de carbon.

Se restabilește presiunea prin readucerea lichidului la același nivel în tuburile (1) și (2). După *câteva minute*, când volumul de gaz a devenit constant, se face citirea.

Se efectuează un test de control, în aceleași condiții, cu 0,5 g de carbonat de calciu (3.2).

**▼B****6. Calculul rezultatelor**

Conținutul de carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu, se calculează prin utilizarea următoarei formule:

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

unde:

X = % (g/g) de carbonați în eșantioane, exprimați ca și carbonat de calciu;

V = ml de CO<sub>2</sub> eliberat de porția de eșantion;

V<sub>1</sub> = ml de CO<sub>2</sub> eliberat de 0,5 g de CaCO<sub>3</sub>;

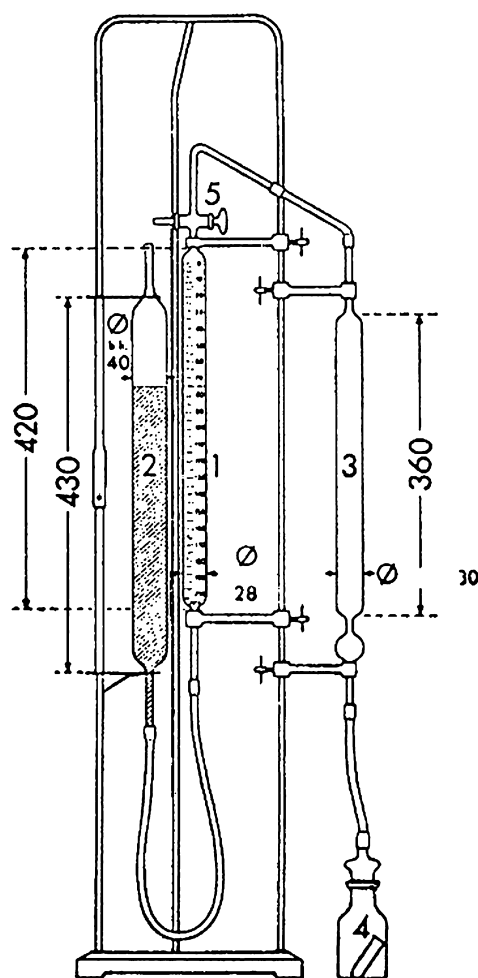
m = greutatea, în grame, a porției de eșantion.

**7. Observații**

7.1. În cazul în care porția de eșantion este mai mare de 2 g, se introduc mai întâi 15 ml de apă distilată în flaconul (4) și se amestecă înainte de începerea testului. În testul de control se utilizează același volum de apă.

7.2. Dacă aparatul utilizat are un volum diferit de cel al aparatului Scheibler-Dietrich, porțiile prelevate din eșantion și din substanța de control, precum și calcularea rezultatelor, trebuie adaptate corespunzător.

Aparat Scheibler-Dietrich pentru determinarea CO<sub>2</sub>



(Dimensiuni în mm)



**▼ B****P. DETERMINAREA FOSFORULUI TOTAL****METODA FOTOMETRICĂ****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de fosfor total. Ea este indicată în special pentru analiza produselor sărace în fosfor. În anumite cazuri (produs bogat în fosfor), se poate utiliza o metodă gravimetrică.

**2. Principiu**

Eșantionul se mineralizează, fie prin combustie uscată (în cazul furajelor organice), fie prin dizolvare în mediu acid (în cazul furajelor combinate conținând minerale și al celor lichide), iar apoi se introduce în soluție acidă. Soluția se tratează cu reactivul molibdovanadat. Densitatea optică a soluției galbene astfel formate se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm.

**3. Reactivi**

3.1. Carbonat de calciu.

3.2. Acid clorhidric,  $\rho_{20} = 1,10$  g/ml (aproximativ 6 mol/litru).

3.3. Acid azotic,  $\rho_{20} = 1,045$  g/ml.

3.4. Acid azotic,  $\rho_{20} = 1,38-1,42$  g/ml.

3.5. Acid sulfuric,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.

3.6. Reactiv molibdovanadat: se amestecă 200 ml de soluție de heptamolibdat de amoniu (3.6.1), 200 ml de soluție de monovanadat de amoniu (3.6.2) și 134 ml de acid azotic (3.4) într-un balon gradat de 1 litru. Se completează până la volum cu apă.

3.6.1. Soluție de heptamolibdat de amoniu: se dizolvă în apă fierbinte 100 g de heptamolibdat de amoniu  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se adaugă 10 ml de amoniac (concentrație 0,91 g/ml) și se completează cu apă până la 1 litru.

3.6.2. Soluție de monovanadat de amoniu: se dizolvă 2,35 g de monovanadat de amoniu  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  în 400 ml de apă fierbinte. Amestecând constant, se adaugă lent 20 ml de acid azotic diluat [7 ml de  $\text{HNO}_3$  (3.4) + 13 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ] și se completează cu apă până la 1 litru.

3.7. Soluție etalon de 1 mg de fosfor per ml: se dizolvă 4,387 g de fosfat diacid de potasiu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  în apă. Se completează cu apă până la 1 litru.

**4. Aparatură**

4.1. Creuzete pentru calcinare din silice, porțelan sau platină.

4.2. Cuptor cu muflă electric, dotat cu termostat reglat la 550 °C.

4.3. Flacon Kjeldahl de 250 ml.

4.4. Baloane gradate și pipete de precizie.

4.5. Spectrofotometru.

4.6. Eprubete cu diametru de aproximativ 16 mm, cu dopuri gradate la un diametru de 14,5 mm; capacitate: 25-30 ml.

**5. Procedură****5.1. Prepararea soluției**

În funcție de natura eșantionului, soluția se prepară astfel cum se indică la punctul 5.1.1 sau 5.1.2.

**5.1.1. Procedura uzuală**

Se cântărește 1 g de eșantion, sau mai mult, cu o abatere de 1 mg. Se introduce eșantionul de testat într-un flacon Kjeldahl, se adaugă 20 ml de acid sulfuric (3.5), se agită pentru a impregna complet substanța cu acid și pentru a preveni ca substanța să adere pe pereții flaconului, se încălzește și se menține la punctul de fierbere timp de 10 minute. Se lasă să se răcească ușor, se adaugă 2 ml de acid azotic (3.4), se încălzește

**▼B**

ușor, se lasă să se răcească ușor, se mai adaugă puțin acid azotic (3.4) și se reduce la punctul de fierbere. Se repetă această procedură până se obține o soluție incoloră. Se răcește, se adaugă puțină apă, se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml clătind flaconul Kjeldahl cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează.

5.1.2. *Eșantioane care conțin substanțe organice și sunt lipsite de fosfați diacizi de calciu și magneziu*

Se cântăresc aproximativ 2,5 g de eșantion cu abatere de 1 mg într-un creuzet de calcinare. Se amestecă eșantionul de testat cu 1 g de carbonat de calciu (3.1) până când se obține un amestec complet omogen. Se calcinează în cuptor la 550 °C până se obține o cenușă albă sau gri (o cantitate mică de cărbune se ignoră). Se transferă cenușa într-un pahar de laborator de 250 ml. Se adaugă 20 ml de apă și acid clorhidric (3.2) până când efervescenta încetează. Se adaugă încă 10 ml de acid clorhidric (3.2). Se așează paharul de laborator pe o baie de nisip și se evaporă până la uscare, pentru a face silicea insolubilă. Se redizolvă reziduul în 10 ml de acid azotic (3.3) și se fierbe pe baia de nisip sau pe o plită timp de 5 minute, fără a se evapora până la uscare. Se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml, clătind paharul de mai multe ori cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează.

5.2. *Apariția colorației și măsurarea densității optice*

Se diluează o parte alicotă de filtrat obținut ca la punctul 5.1.1 sau 5.1.2 pentru a obține o concentrație de fosfor de maximum 40 μg/ml. Se introduc 10 ml din această soluție într-o eprubetă (4.6) și se adaugă 10 ml de reactiv molibdovanadat (3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm, prin comparație cu o soluție obținută prin adăugarea de 10 ml de reactiv molibdovanadat (3.6) la 10 ml de apă.

5.3. *Curba de calibrare*

Din soluția etalon (3.7) se prepară soluții care conțin 5, 10, 20, 30 și 40 μg de fosfor per ml, respectiv. Se iau 10 ml din fiecare din aceste soluții și se adaugă la 10 ml de reactiv molibdovanadat (3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară astfel cum se indică la punctul 5.2. Se trasează curba de calibrare prin înscrierea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile corespunzătoare de fosfor. Pentru concentrații cuprinse între 0 și 40 μg/ml, curba va fi liniară.

6. **Calculul rezultatelor**

Cantitatea de fosfor din eșantionul de testat se determină prin utilizarea curbei de calibrare.

Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășesc:

— 3 %, relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fosfor mai mic de 5 %;

— 0,15 % în valoare absolută, pentru un conținut de fosfor egal sau mai mare de 5 %.

**▼B****Q. DETERMINAREA CLORULUI DIN CLORURI****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea cantității de clor din clorurile solubile în apă, exprimate convențional ca clorură de sodiu. Este aplicabilă tuturor furajelor.

**2. Principiu**

Clorurile se dizolvă în apă. Dacă produsul conține materii organice, se limpezește. Soluția se acidifică ușor cu acid azotic, iar clorurile precipită sub formă de clorură de argint cu ajutorul unei soluții de nitrat de argint. Excesul de nitrat de argint se titrează cu o soluție de tiocianat de amoniu, prin metoda Volhard.

**3. Reactivi**

- 3.1. Soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/litru.
- 3.2. Soluție de nitrat de argint 0,1 mol/litru.
- 3.3. Soluție saturată de sulfat feric de amoniu  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ .
- 3.4. Acid azotic, concentrație: 1,38 g/ml.
- 3.5. Eter dietilic.
- 3.6. Acetonă.
- 3.7. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.8. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.
- 3.9. Cărbune activ, lipsit de cloruri și fără a le absorbi.

**4. Aparatură**

Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.

**5. Procedură****5.1. Prepararea soluției**

În funcție de natura eșantionului, se prepară o soluție conform indicațiilor de la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3.

În același timp, se efectuează un *test martor* fără eșantionul de analizat.

**5.1.1. Eșantioane fără materii organice**

Se cântăresc maximum 10 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, care conțin maximum 3 g de clor sub formă de cloruri. Se introduc, împreună cu 400 ml de apă, într-un balon gradat de 500 ml la aproximativ 20 °C. Se amestecă timp de treizeci de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

**5.1.2. Eșantioane care conțin materii organice, exceptând produsele menționate la punctul 5.1.3**

Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc, împreună cu 1 g de cărbune activ, într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml apă la aproximativ 20 °C și 5 ml de soluție Carrez I (3.7), se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (3.8). Se amestecă timp de treizeci de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

**▼B**

- 5.1.3. Furaje preparate termic, turte și făină de in, produse bogate în făină de in și alte produse bogate în mucilagii sau în substanțe coloidale (de exemplu amidon dextrinat)

Se prepară soluția astfel cum se descrie la punctul 5.1.2, dar nu se filtrează. Se decantează (dacă este necesar, se centrifughează), se îndepărtează 100 ml lichid supernatant și se transferă într-un flacon de măsurare de 200 ml. Se amestecă cu acetonă (3.6) și se aduce la volum cu acest solvent, se omogenizează și se filtrează.

- 5.2. *Titarea*

Cu ajutorul unei pipete, se transferă într-un flacon Erlenmeyer o cantitate cuprinsă între de 25 și 100 ml de filtrat (în funcție de conținutul anticipat de clor), obținut astfel cum se descrie la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3. Porția alicotă nu trebuie să conțină mai mult de 150 mg de clor (Cl). Dacă este necesar, se diluează cu maximum 50 ml de apă, se adaugă 5 ml acid azotic (3.4), 20 ml de soluție saturată de sulfat feric de amoniu (3.3) și două picături de soluție de tiocianat de amoniu (3.1) transferată cu ajutorul unei biurete umplute până la gradația zero. Cu ajutorul unei biurete, se transferă soluția de nitrat de argint (3.2) astfel încât să se obțină un exces de 5 ml. Se adaugă 5 ml de eter dietilic (3.5) și se agită puternic pentru a coagula precipitatul. Excesul de nitrat de argint se titrează cu soluția de tiocianat de amoniu (3.1) până când colorația maro-roșcat a persistat timp de un minut.

6. **Calculul rezultatelor**

Cantitatea de clor (X), exprimată ca % de clorură de sodiu, se calculează cu ajutorul următoarei formule:

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

unde:

$V_1$  = ml de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l adăugată;

$V_2$  = ml de soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/l utilizată la titrare;

m = greutatea eșantionului.

Dacă testul martor indică un consum de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l, se deduce această valoare din volum ( $V_1 - V_2$ ).

7. **Observații**

- 7.1. Titarea se poate face și prin potențiometrie.
- 7.2. În cazul produselor foarte bogate în uleiuri și grăsimi, se procedează mai întâi la o degresare cu eter dietilic sau cu eter de petrol.
- 7.3. În cazul făinii de pește, titrarea se poate efectua prin metoda Mohr.



ANEXA IV

**METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLAREA NIVELULUI AUTORIZAT DE ADITIVI DIN FURAJE**

A. DETERMINAREA VITAMINEI A

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină A (retinol) din furaje și premixuri. Vitamina A include alcoolul all-*trans*-retinil și izomerii săi *cis*, care se determină prin această metodă. Conținutul de vitamină A se exprimă în unități internaționale (UI) per kg. O UI corespunde activității a 0,3 μg de alcool all-*trans*-vitamină A sau a 0,344 μg all-*trans*-vitamină A acetat sau 0,550 μg all-*trans*-vitamină A palmitat.

Limita de cuantificare este 2 000 UI de vitamină A/kg.

2. **Principiu**

Eșantionul se hidrolizează cu o soluție de hidroxid de potasiu etanolic, iar vitamina A se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol și, dacă este cazul, se diluează până la concentrația necesară. Conținutul de vitamină A se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector de UV sau de fluorescență. Parametrii cromatografiei se aleg astfel încât să nu existe separație între alcoolul all-*trans*-vitamina A și izomerii săi *cis*.

3. **Reactivi**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$ .
- 3.2. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Soluție de hidroxid de potasiu,  $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$ .
- 3.5. Soluție de ascorbat de sodiu,  $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$  (a se vedea observațiile de la punctul 7.7).
- 3.6. Sulfură de sodiu,  $\text{Na}_2\text{S}\cdot x\text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ ).
- 3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu,  $c = 0,5\text{ mol}/\text{l}$  în glicerol,  $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$  (pentru  $x = 9$ ) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8).
- 3.7. Soluție de fenolftaleină,  $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$  în etanol (3.1).
- 3.8. 2-propanol.
- 3.9. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (3.3) și apă, de exemplu  $980 + 20$  ( $v + v$ ). Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite.
- 3.10. Azot, lipsit de oxigen
- 3.11. All-*trans*-vitamină A acetat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu  $2,80 \times 10^6\text{ UI}/\text{g}$
- 3.11.1. Soluție stoc de all-*trans*-vitamină A acetat: se cântăresc 50 mg de vitamină A acetat (3.11) cu o abatere de 0,1 mg într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamină A palmitat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu  $1,80 \times 10^6\text{ UI}/\text{g}$

**▼B**

3.12.1. Soluție stoc de all-*trans*-vitamină A palmitat: se cântăresc 80 mg de vitamină A palmitat (3.12) cu o abatere de 0,1 mg într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*terț*-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5).

**4. Aparatură**

4.1. Evaporator rotativ cu vid.

4.2. Sticlărie laborator brună.

4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.

4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml.

4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită.

4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.

4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz.

4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție

4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, cu particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent (criteriu de performanță: un singur vârf pentru toți izomerii de retinol în condițiile HPLC).

4.5.2. Detector de UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă.

4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm.

4.7. Baie de apă cu agitator magnetic.

4.8. Aparat de extracție (vezi figura 1) compus din:

4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite.

4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

**5. Procedură**

*Notă:* Vitamina A este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (utilizând sticlărie brună sau protejată cu o folie de aluminiu) și a oxigenului (alimentare cu azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

5.1. *Prepararea eșantionului*

Se macină eșantionul astfel încât să poată trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea se efectuează **imediat** înainte de cântărire și saponificare, altfel pot exista pierderi de vitamină A.

**▼B**5.2. *Saponificarea*

În funcție de conținutul de vitamină A, se cântăresc 2-25 g de eșantion cu o abatere de 1 mg într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (4.2.1). Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (3.1), aproximativ 100 mg de BHT (3.13), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (3.6). Se montează un condensator (4.3) la balon și acesta se scufundă într-o baie de apă cu agitator magnetic (4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (3.4) prin condensator (4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând continuu sub un jet slab de azot. Apoi se clătește condensatorul cu aproximativ 20 ml de apă, iar conținutul balonului se lasă să se răcească la temperatura camerei.

5.3. *Extracția*

Se transferă cantitativ prin decantare soluția de saponificare clătind cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (4.2.3) sau în aparatul de extracție (4.8). Se clătește balonul utilizat la saponificare succesiv cu 25 ml de etanol (3.1) și 100 ml de eter de petrol (3.2), iar lichidul de clătire se transferă în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de aproximativ 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă la decantat timp de 2 minute.

5.3.1. *Extracția cu ajutorul unei pâlnii de separare (4.2.3)*

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (4.2.3). Se repetă de două ori această extracție cu 100 ml de eter de petrol (3.2), apoi de încă două ori cu 50 ml de eter de petrol (3.2).

Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare agitând circular ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu porții de 100 ml de apă și repetând agitarea cu alte porții de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră la adăugarea de soluție de fenolftaleină (3.7) (patru spălări sunt de obicei suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru plisat uscat pentru separarea fazelor (4.4) cu scopul de a se îndepărta apa suspendată într-un balon gradat de 500 ml (4.2.2). Se clătește pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml de eter de petrol (3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. *Extracția cu ajutorul unui aparat de extracție (4.8)*

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (4.8.1) cu piesa din sticlă șlefuită (4.8.2) și se amplasează capătul inferior în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune din linia de azot asupra țigii laterale, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml de eter de petrol (3.2), apoi de două ori cu porții de 50 ml de eter de petrol (3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol astfel cum se descrie la punctul 5.3.1 și se procedează astfel cum se descrie la punctul respectiv.

5.4. *Prepararea soluției eșantion pentru HPLC*

Se pipetează o porție alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un flacon piriform de 250 ml (4.2.4). Se evaporă solventul aproape până la uscare în evaporatorul rotativ (4.1) cu

**▼B**

presiune redusă la o temperatură a băii care să nu depășească 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (3.10) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un jet de azot (3.10), iar reziduul se dizolvă imediat într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (3.3) (concentrația de vitamină A trebuie să fie cuprinsă în intervalul 5-30 UI/ml).

5.5. *Determinarea prin HPLC*

Vitamina A se separă pe o coloană cu fază inversată C<sub>18</sub> (4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de UV (325 nm) sau un detector de fluorescență (excitație: 325 nm, emisie: 475 nm) (4.5.2).

Se injectează o porție alicotă (de exemplu 20 μl) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (3.9). Se calculează înălțimea medie a vârfului (aria) mai multor injectări ale aceleiași soluții de eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor mai multor injectări ale soluțiilor de calibrare (5.6.2).

## Condiții HPLC

Următoarele condiții se oferă cu titlu orientativ; se pot aplica alte condiții cu condiția ca ele să genereze rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (3.9):	Mixtură de metanol (3.3) și apă, de exemplu 980 + 20 (v + v).
Rata fluxului:	1-2 ml/minut
Detector (4.5.2):	detector de UV (325 nm) sau detector de fluorescență (excitație: 325 nm/emisie: 475 nm).

5.6. *Calibrarea*5.6.1. *Prepararea soluțiilor etalon de lucru*

Se pipetează 20 ml de soluție stoc de vitamină A acetat (3.11.1) sau 20 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (3.12.1) într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (4.2.1) și se hidrolizează astfel cum se descrie la punctul 5.2, dar fără a se adăuga BHT. În continuare se extrage cu eter de petrol (3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (3.2). Se evaporă 100 ml din acest extract în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4) aproape până la uscare, se îndepărtează solventul care rămâne cu un jet de azot (3.10) și se redizolvă reziduul în 10 ml de metanol (3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 560 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.3. Soluția etalon de lucru trebuie proaspăt preparată înainte de utilizare.

Se pipetează 2 ml din această soluție etalon de lucru într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (3.3) și se amestecă. Concentrația nominală a acestei soluții etalon de lucru **diluate** este de 56 UI de vitamină A per ml.

5.6.2. *Prepararea soluțiilor de calibrare și curba de calibrare*

Se transferă 1, 2, 5 și 10 ml din soluția etalon de lucru **diluată** într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt de 2,8, 5,6, 14 și respectiv 28 UI de vitamină A per ml.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile medii (ariile) ale vârfurilor. Utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare ținând cont de rezultatele obținute cu soluția de control UV (5.6.3.3).



**▼B**

## 5.6.3. Standardizarea UV a soluțiilor etalon

5.6.3.1. *Soluția stoc de vitamină A acetat*

Se pipetează 2 ml din soluția stoc de vitamină A acetat (3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml (4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI de vitamină A per ml. Se pipetează 3 ml din această soluție diluată de vitamină A acetat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI de vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (3.8), în spectrofotometru (4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{326} \times 19$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A acetat} = 1\,530 \text{ la } 326 \text{ nm în } 2\text{-propanol})$$

5.6.3.2. *Soluția stoc de vitamină A palmitat*

Se pipetează 2 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (3.12.1) într-un balon gradat de 50 ml (4.2.2) și se completează până la gradajie cu propanol-2 (3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI de vitamină A per ml. Se pipetează 3 ml din această soluție diluată de vitamină A palmitat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI de vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (3.8), în spectrofotometru (4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{326} \times 19$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A palmitat} = 957 \text{ la } 326 \text{ nm în } 2\text{-propanol})$$

5.6.3.3. *Soluția etalon de lucru de vitamină A*

Se pipetează 3 ml din soluția etalon de lucru **nediluată** de vitamină A, preparată conform punctului 5.6.1, într-un balon gradat de 50 ml (4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (3.8). Se pipetează 5 ml din această soluție într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI de vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (3.8), în spectrofotometru (4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{326} \times 18,3$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A alcool} = 1\,821 \text{ la } 325 \text{ nm în } 2\text{-propanol})$$

6. **Calculul rezultatelor**

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de vitamină A ale soluției de eșantion se determină concentrația soluției de eșantion în UI/ml prin referire la curba de calibrare (5.6.2).

**▼B**

Conținutul  $w$  de vitamină A al eșantionului, în UI/kg, este dat de următoarea formulă:

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

în care:

$c$  = concentrația de vitamină A a soluției de eșantion (5.4), în UI/ml;  
 $V_1$  = volumul soluției de eșantion (5.4), în ml;  
 $V_2$  = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml;  
 $m$  = greutatea porției de testat, în g.

## 7. Observații

- 7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină A poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC.
- 7.2. Greutatea eșantionului prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsimi.
- 7.3. Dacă separarea fazelor nu are loc, se adaugă aproximativ 10 ml de etanol (3.1) pentru a fragmenta emulsia.
- 7.4. În cazul uleiului din ficat de cod și al altor grăsimi pure, timpul de saponificare se prelungește la 45-60 minute.
- 7.5. Hidrochinona poate fi folosită în locul BHT.
- 7.6. Utilizându-se o coloană cu fază normală, separarea izomerilor de retinol este posibilă. Dar în acest caz, înălțimile (ariile) vârfurilor izomerilor *all-cis* și *all-trans* trebuie însumate pentru a face calcule.
- 7.7. Se pot folosi aproximativ 150 mg de soluție de acid ascorbic în locul soluției de ascorbat de sodiu.
- 7.8. Se pot folosi aproximativ 50 mg de EDTA în locul soluției de sulfură de sodiu.
- 7.9. În cazul analizării vitaminei A în înlocuitorii de lapte, se acordă o atenție deosebită la:
  - saponificare (5.2): din cauza cantității de grăsimi prezente în eșantion, poate fi necesară creșterea cantității de soluție de hidroxid de potasiu (3.4);
  - extracție (5.3): din cauza prezenței emulsiilor, poate fi necesară adaptarea valorii raportului de 2:1 pentru apă/etanol.

Pentru a verifica dacă metoda de analizare aplicată generează rezultate fiabile pentru această matrice specifică (înlocuitor de lapte), se aplică un test de recuperare pe o porție suplimentară de testat. Dacă rata de recuperare este mai mică de 80 %, rezultatul analitic trebuie corectat în funcție de recuperare.

## 8. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % relativ la rezultatul mai mare.

**▼B**9. **Rezultatele unui studiu colaborativ <sup>(1)</sup>**

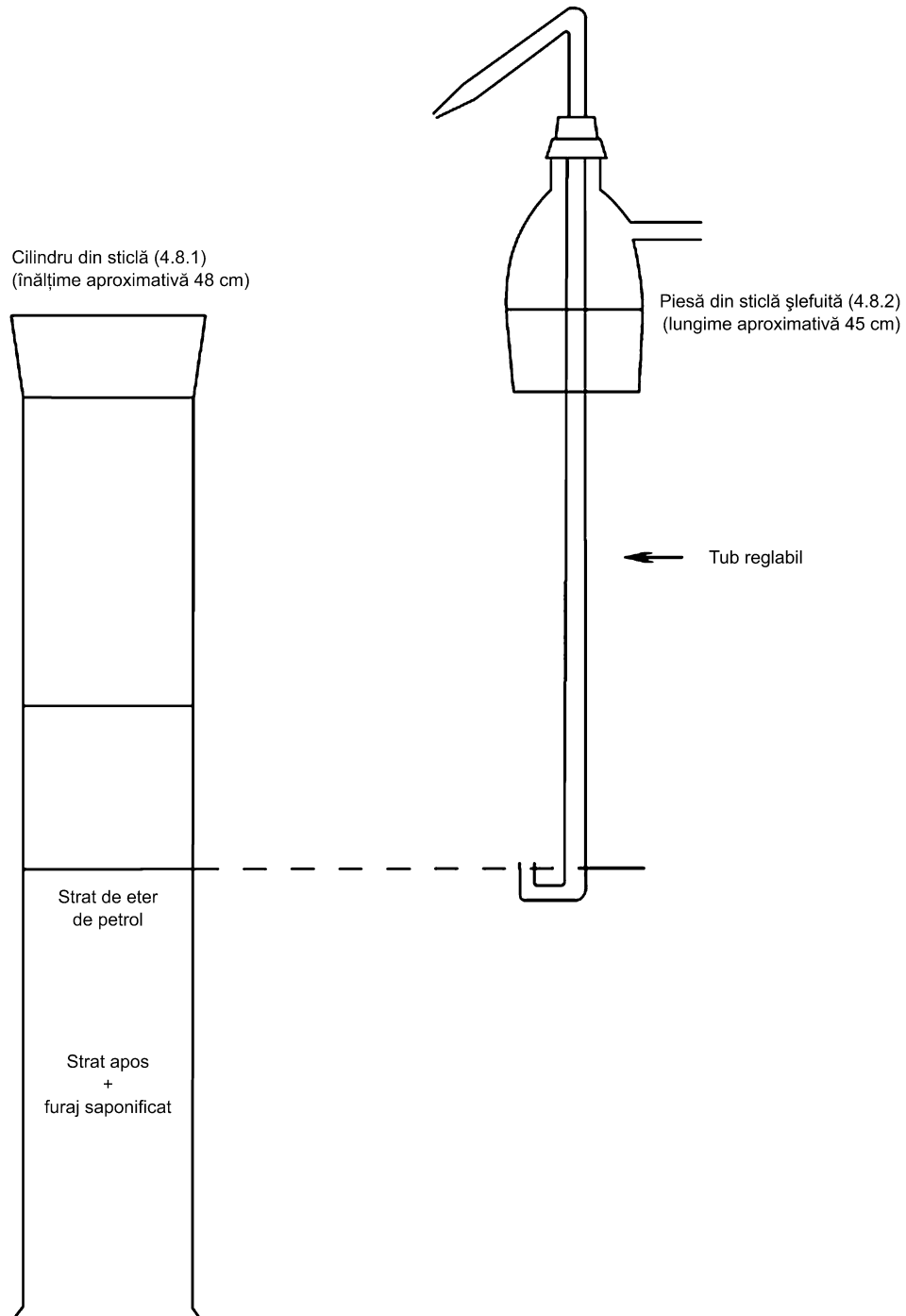
	Premix	Furaje tip premix	Concentrate minerale	Furaje proteice	Furaje pentru purcei
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
medie (UI/kg)	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
$s_r$ (UI/kg)	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r (UI/kg)	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
$CV_r$ (%)	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
$S_R$ (UI/kg)	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R (UI/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 = număr de laboratoare;  
 n = număr de valori individuale;  
 $s_r$  = devierea standard a repetabilității;  
 $S_R$  = devierea standard a reproductibilității;  
 r = repetabilitate;  
 R = reproductibilitate;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație al repetabilității;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație al reproductibilității.

<sup>(1)</sup> Realizat de Grupul de lucru pentru furaje al Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Figura 1  
Aparat de extracție (4.8)



**▼B****B. DETERMINAREA VITAMINEI E****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină E din furaje și premixuri. Conținutul de vitamină E se exprimă ca mg DL- $\alpha$ -tocoferol acetat per kg. 1 mg DL- $\alpha$ -tocoferol acetat corespunde la 0,91 mg DL- $\alpha$ -tocoferol (vitamină E).

Limita de cuantificare este 2 mg de vitamină E/kg. Această limită de cuantificare se obține doar cu detectorul de fluorescență. Cu un detector de UV, limita de cuantificare este 10 mg/kg.

**2. Principiu**

Eșantionul se hidrolizează cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu, iar vitamina E se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol și, dacă este necesar, se diluează până la concentrația necesară. Conținutul de vitamina E se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de fluorescență sau de UV.

**3. Reactivi**

- 3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$ .
- 3.2. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Soluție de hidroxid de potasiu,  $c = 50$  g/100 ml.
- 3.5. Soluție de ascorbat de sodiu,  $c = 10$  g/100 ml (a se vedea observațiile de la punctul 7.7).
- 3.6. Sulfură de sodiu,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ ).
- 3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu,  $c = 0,5$  mol/l în glicerol,  $\beta = 120$  g/l (pentru  $x = 9$ ) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8).
- 3.7. Soluție de fenolftaleină,  $c = 2$  g/100 ml în etanol (3.1).
- 3.8. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (3.3) și apă, de exemplu 980 + 20 ( $v + v$ ). Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite.
- 3.9. Azot, lipsit de oxigen.
- 3.10. DL- $\alpha$ -tocoferol acetat, extra pur, cu activitate certificată
- 3.10.1. Soluție stoc de DL- $\alpha$ -tocoferol acetat: se cântăresc 100 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol acetat (3.10) cu o abatere de 0,1 mg într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol acetat. (pentru control UV vezi 5.6.1.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4).
- 3.11. DL- $\alpha$ -tocoferol, extra pur, cu activitate certificată
- 3.11.1. Soluția stoc de DL- $\alpha$ -tocoferol: se cântăresc 100 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11) cu o abatere de 0,1 mg într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol. (Pentru control UV a se vedea 5.6.2.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*terț*-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5).

**4. Aparatură**

- 4.1. Evaporator rotativ cu generare de film.

**▼ B**

- 4.2. Sticlărie laborator brună.
- 4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.
- 4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml.
- 4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită.
- 4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.
- 4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz.
- 4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție
- 4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent.
- 4.5.2. Detector de fluorescență sau de UV, cu ajustare variabilă a lungimii de undă.
- 4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm.
- 4.7. Baie de apă cu agitator magnetic.
- 4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din:
  - 4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite.
  - 4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

**5. Procedura**

*Notă:* Vitamina E este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

**5.1. Pregătirea eșantionului**

Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată **imediat** înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina E.

**5.2. Saponificarea**

În funcție de greutatea conținutului de vitamina E, se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, 2-25 g de eșantion într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (4.2.1). Se adaugă succesiv, agitând circular, 130 ml de etanol (3.1), cca 100 mg de BHT (3.12), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (3.6). Se montează un condensator (4.3) la vas și se introduce vasul într-o baie de apă cu agitator magnetic (4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (3.4) prin condensator (4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei.

**▼B**5.3. *Extracție*

Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (4.2.3) sau în aparatul de extracție (4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (3.1) și 100 ml de eter de petrol (3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute, și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute.

5.3.1. *Extracția folosind o pâlnie de separare (4.2.3)*

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (3.2).

Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. *Extracția folosind un aparat de extracție (4.8)*

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat.

5.4. *Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC*

Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisie de azot (3.9) și se îndepărtează balonul de pe evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un curent de azot (3.9) și se dizolvă imediat reziduul într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (3.3) (concentrația de DL- $\alpha$ -tocoferol trebuie să fie de ordinul a 5-30  $\mu\text{g/ml}$ ).

5.5. *Determinarea prin HPLC*

Vitamina E se separă pe o coloană C<sub>18</sub> cu fază inversată (4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de fluorescență (excitație: 295 nm, emisie: 330 nm) sau cu un detector de UV (292 nm) (4.5.2).

**▼B**

Se injectează o parte alicotă (de exemplu 20 µl) din soluția metanolică obținută conform punctului 5.4 și se eluează cu faza mobilă (3.8). Se calculează înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale aceleiași soluții eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale soluțiilor de calibrare (5.6.2).

**Condiții HPLC**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particule de 5 sau 10 µm sau echivalent
Faza mobilă (3.8):	Amestec de metanol (3.3) și apă de exemplu 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/minut
Detector (4.5.2)	Detector de fluorescență (excitație: 295 nm/emisie: 330 nm) sau detector de UV (292 nm)

5.6. *Calibrare (acetat de DL-α-tocopherol sau DL-α-tocopherol)*

## 5.6.1. Etalon de acetat de DL-α-tocopherol

5.6.1.1. *Prepararea soluției etalon de lucru*

Se picură din pipetă 25 ml din soluția stoc de acetat de DL-α-tocopherol (3.10.1) într-un balon cu fundul plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (4.2.1) și se hidrolizează conform procedurii descrise la punctul 5.2. Se realizează apoi extracția cu eter de petrol (3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol. Se lasă să se evapore 25 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (3.9) și se dizolvă din nou reziduul în 25 ml de metanol (3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 45,5 µg DL-α-tocopherol per ml, echivalent cu 50 µg acetat de DL-α-tocopherol per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.1.2. *Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare*

Se transferă 1, 2, 4 și 10 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,5, 5, 10 și 25 µg/ml acetat de DL-α-tocopherol, echivalent cu 2,28, 4,55, 9,1 µg/ml și 22,8 µg/ml DL-α-tocopherol.

Se injectează de mai multe ori câte 20 µl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.1.3. *Standardizarea UV a soluției stoc de acetat de DL-α-tocopherol (3.10.1)*

Se diluează 5 ml din soluția stoc de acetat de DL-α-tocopherol (3.10.1) în 25 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (3.1) în spectrofotometru (4.6), între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă este de 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ la } 284 \text{ nm în etanol}$$

La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție între 0,84 și 0,88.



**▼B**5.6.2. Etalonul de DL- $\alpha$ -tocoferol5.6.2.1. *Prepararea soluției etalon de lucru*

Se pun cu pipeta 2 ml din soluția stoc de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml, se dizolvă în metanol (3.3) și se completează până la semn cu metanol. Concentrația nominală a acestei soluții este de 40  $\mu\text{g}$  DL- $\alpha$ -tocoferol per ml, echivalent cu 44  $\mu\text{g}$  acetat DL- $\alpha$ -tocoferol per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.2.2. *Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare*

Se transferă 1, 2, 4 și 10 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2, 4, 8 și 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DL- $\alpha$ -tocoferol, echivalent cu 2,24,4, 8,79  $\mu\text{g}/\text{ml}$  și 22  $\mu\text{g}/\text{ml}$  acetat de DL- $\alpha$ -tocoferol.

Se injectează de mai multe ori câte 20  $\mu\text{l}$  din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.2.3. *Standardizarea UV a soluției stoc de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1)*

Se diluează 2 ml din soluția stoc de DL- $\alpha$ -tocoferol (3.11.1) în 25 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (3.1) în spectrofotometru (4.6) între 250 nm și 320 nm. Absorbția maximă este de 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ la } 292 \text{ nm în etanol}$$

La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție de 0,6.

6. **Calculul rezultatelor**

Pornindu-se de la înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de vitamina E ale soluției de eșantion, se determină concentrația soluției de eșantion în  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (calculată ca acetat de  $\alpha$ -tocoferol) prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.1.2 sau 5.6.2.2).

Conținutul  $w$  de vitamina E al eșantionului, exprimat în  $\text{mg}/\text{kg}$ , este dat de următoarea formulă:

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

unde:

$c$  = concentrația de vitamina E (ca acetat de  $\alpha$ -tocoferol) al soluției de eșantion (5.4) în  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;

$V_1$  = volumul soluției de eșantion (5.4), în ml;

$V_2$  = volumul părții alicote luate conform punctului 5.4, în ml;

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g.

7. **Observații**

7.1. Pentru eșantioanele cu o concentrație redusă de vitamina E, poate fi utilă combinarea extractelor în eter de petrol provenite din două saponificări (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinarea prin HPLC.

7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsime.

7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (3.1) pentru a fragmenta emulsia.

**▼B**

- 7.4. Odată efectuată măsurătoarea spectrofotometrică a soluției de acetat de DL- $\alpha$ -tocoferol sau de DL- $\alpha$ -tocoferol, conform punctului 5.6.1.3 sau 5.6.2.3, se adaugă cca 10 mg de BHT (3.12) la soluție (3.10.1 sau 3.10.2) și se conservă soluția la frigider (durata maximă de stocare patru săptămâni).
- 7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă.
- 7.6. Utilizându-se o coloană în fază normală este posibilă separarea tocoferolilor  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  și  $\delta$ .
- 7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic.
- 7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA.
- 7.9. Acetatul de vitamina E hidrolizează foarte rapid în condiții alcaline fiind, prin urmare, foarte sensibil la oxidare, mai ales în prezența oligoelementelor, cum ar fi fierul sau cuprul. Determinarea vitaminei E în premixuri la niveluri de peste 5 000 mg/kg ar avea drept consecință o degradare a vitaminei E. Prin urmare, pentru confirmare se recomandă o metodă HPLC care include o formulă pentru dizolvarea enzimatică a vitaminei E în absența fazei de saponificare alcalină.
8. **Repetabilitate**
- Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.
9. **Rezultatele unui studiu colaborativ <sup>(1)</sup>**

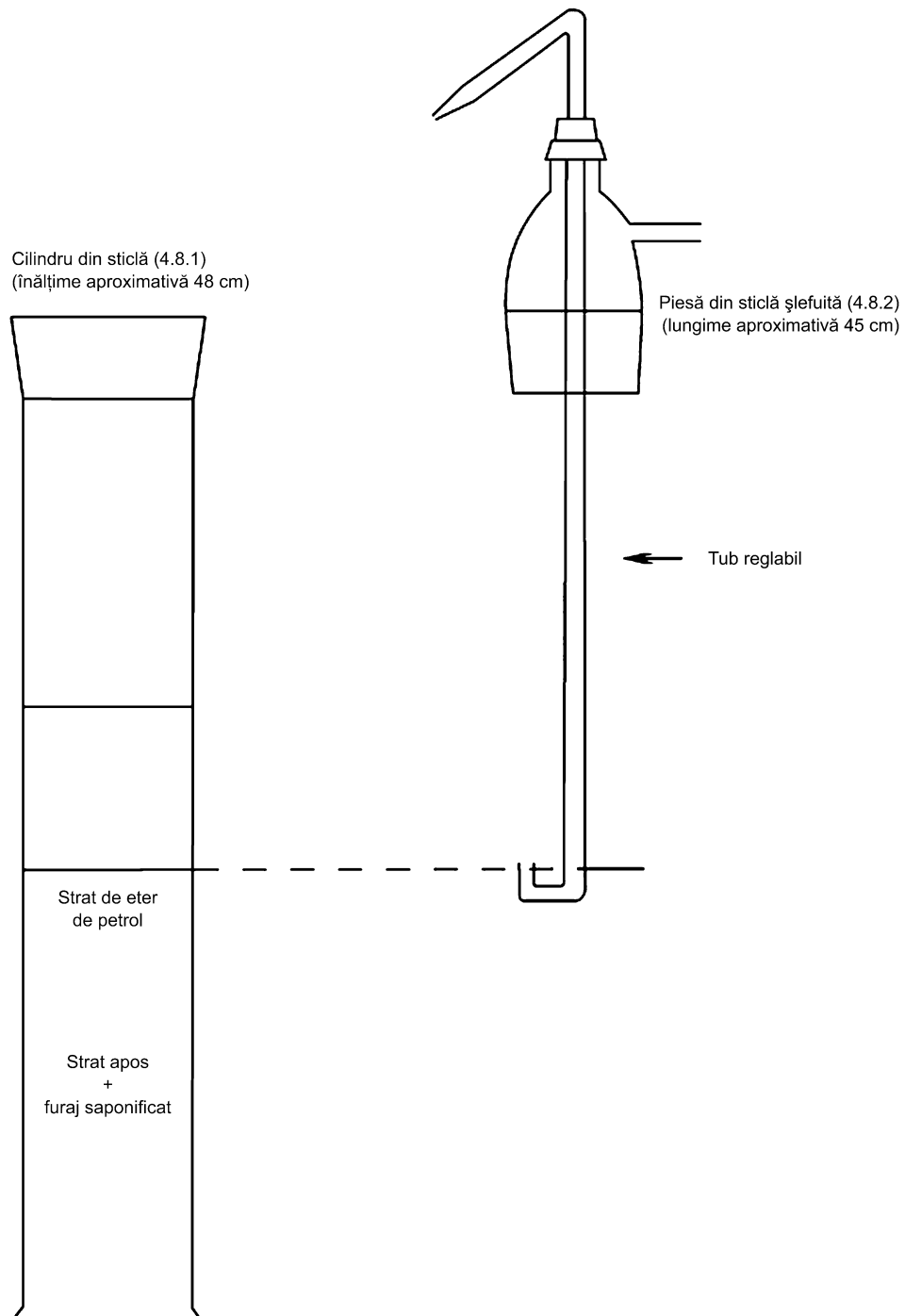
	Premix	Furaje cu premix	Concentrat mineral	Furaje proteice	Hrană pentru porci
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
medie (mg/kg)	17 380	1 187	926	315	61,3
$s_r$ (mg/kg)	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r (mg/kg)	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
$CV_r$ (%)	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
$S_R$ (mg/kg)	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R (mg/kg)	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
$CV_R$ (%)	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

- L = număr de laboratoare;  
n = număr de valori individuale;  
 $s_r$  = deviația standard a repetabilității;  
 $S_R$  = deviația standard a reproductibilității;  
r = repetabilitate;  
R = reproductibilitate;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității.

<sup>(1)</sup> Studiu realizat de Grupul de lucru pentru furaje Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Figura 1  
Aparat de extracție (4.8)



**▼B****C. DETERMINAREA OLIGOELEMENTELOR FIER, CUPRU, MANGAN ȘI ZINC****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea oligoelementelor fier, cupru, mangan și zinc din furaje. Limitele de cuantificare sunt:

— fier (Fe): 20 mg/kg

— cupru (Cu): 10 mg/kg

— mangan (Mn): 20 mg/kg

— zinc (Zn): 20 mg/kg

**2. Principiu**

Eșantionul este pus în soluție de acid clorhidric după distrugerea materiei organice, dacă aceasta este prezentă. Se determină elementele fier, cupru, mangan și zinc, după o diluare corespunzătoare, cu ajutorul spectrometriei de absorbție atomică.

**3. Reactivi***Comentarii introductive*

Pentru prepararea reactivilor și a soluțiilor analitice se folosește apă fără cationii care urmează să fie determinați, obținută fie prin distilarea dublă a apei într-un distilator din sticlă borosilicat sau din cuarț, fie prin dublu tratament cu rășină schimbătoare de ioni.

Reactivii trebuie să fie cel puțin de calitate analitică. Absența elementului care urmează să fie determinat trebuie verificată într-un experiment martor. Dacă este necesar, reactivii trebuie să fie purificați în continuare.

În locul soluțiilor etalon descrise mai jos pot fi folosite soluții etalon din comerț, cu condiția ca ele să fie garantate și să fi fost verificate înainte de utilizare.

- 3.1. Acid clorhidric (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Acid clorhidric (6 mol/litru).
- 3.3. Acid clorhidric (0,5 mol/litru).
- 3.4. Acid fluorhidric 38-40 % (v/v) cu un conținut de fier (Fe) de mai puțin de 1 mg/litru și un reziduu după evaporare de mai puțin de 10 mg (ca sulfat)/litru.
- 3.5. Acid sulfuric (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Peroxid de hidrogen [circa 100 volume de oxigen (30 % în greutate)].
- 3.7. Soluție etalon de fier (1 000 μg Fe/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: se dizolvă 1 g de sârmă de fier în 200 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2), se adaugă 16 ml de peroxid de hidrogen (3.6) și se completează până la un litru cu apă.
  - 3.7.1. Soluție etalon de lucru de fier (100 μg Fe/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (3.7) cu 9 părți de apă.
- 3.8. Soluție etalon de cupru (1 000 μg Cu/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:
  - se dizolvă 1 g de praf de cupru în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2), se adaugă 5 ml de peroxid de hidrogen (3.6) și se completează până la un litru cu apă.
- 3.8.1. Soluție etalon de cupru de lucru (10 μg Cu/ml) preparată diluând o parte din soluția standard (3.8) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.

**▼ B**

- 3.9. Soluție etalon de mangan (1 000 µg Mn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:
- se dizolvă 1 g de praf de mangan în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2) și se completează până la un litru cu apă.
- 3.9.1. Soluție etalon de lucru de mangan (10 µg Mn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (3.9) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.
- 3.10. Soluție etalon de zinc (1 000 µg Zn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:
- se dizolvă 1 g de zinc sub formă de benzi sau folii în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2) și se completează până la un litru cu apă.
- 3.10.1. Soluție etalon de lucru de zinc (10 µg Zn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (3.10) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.
- 3.11. Soluție de clorură de lantan: se dizolvă 12 g de oxid de lantan în 150 ml de apă, se adaugă 100 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2) și se completează până la un litru cu apă.

**4. Aparatură**

- 4.1. Cuptor cu muflă cu reglare de temperatură și, preferabil, cu dispozitiv de înregistrare.
- 4.2. Sticlăria trebuie să fie de tip borosilicat rezistent și se recomandă folosirea aparaturii rezervate exclusiv pentru determinarea oligoelementelor.
- 4.3. Spectrofotometru de absorbție atomică care îndeplinește cerințele metodei cu privire la sensibilitatea și precizia în intervalul necesar.

**5. Procedură <sup>(1)</sup>****5.1. Eșantioane care conțin materie organică****5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză <sup>(2)</sup>**

- 5.1.1.1. Se introduc 5-10 g de eșantion cântărit cu o abatere de 0,2 mg într-un creuzet de cuarț sau platină [a se vedea nota (b)], se usucă într-un cuptor la 105 °C și se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă neîncălzit (4.1). Se închide cuptorul [a se vedea nota (c)] și se mărește treptat temperatura până la 450-475 °C, timp de circa 90 minute. Se menține temperatura timp de 4-16 ore (de exemplu peste noapte) pentru a îndepărta materialul carbonic și apoi se deschide cuptorul și se lasă să se răcească [a se vedea nota (d)].

<sup>(1)</sup> Se pot folosi alte metode de dizolvare, cu condiția ca acestea să fi fost demonstrate și să aibă rezultate similare (cum ar fi dizolvarea sub presiune cu microunde).

<sup>(2)</sup> Furajul verde (proaspăt sau uscat) poate conține cantități mari de silice vegetală, care ar putea reține oligoelemente și trebuie eliminată. Prin urmare, pentru eșantioane din aceste furaje trebuie urmată următoarea procedură modificată. Se efectuează operația 5.1.1.1 până la filtrare. Hârtia de filtru care conține reziduu insolubil se spală de două ori cu apă clocotită și se așază într-un creuzet de cuarț sau platină. Se încălzește în cuptorul cu muflă (4.1) la o temperatură sub 550 °C, până când materialul carbonic a dispărut complet. Se lasă să se răcească, se adaugă câteva picături de apă urmate de 10-15 ml de acid fluorhidric (3.4) și se evaporază până la uscare la circa 150 °C. Dacă reziduu încă mai conține silice, aceasta se dizolvă din nou în câțiva mililitri de acid fluorhidric (3.4) și se evaporă până la uscare. Se adaugă câteva picături de acid sulfuric (3.5) și se încălzește până când emisiile de fum alb încetează. După ce se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2) și circa 30 ml de apă, se încălzește, se filtrează soluția într-un balon gradat de 250 ml și se completează până la semn cu apă (concentrație a HCl circa 0,5 mol/l). Se trece apoi la determinarea de la punctul 5.1.2.

**▼B**

Se umezește cenușa cu apă și se transferă substanța obținută într-un pahar de laborator de 250 ml. Se spală creuzetul cu o cantitate totală de circa 5 ml de acid clorhidric (3.1) și se adaugă acesta din urmă încet și cu atenție în paharul de laborator (poate apărea o reacție puternică din cauza formării de CO<sub>2</sub>). Se adaugă acid clorhidric (3.1), picătură cu picătură, agitându-se, până când efervescența încetează. Se evaporă până la uscare, agitându-se din când în când cu o baghetă de sticlă.

Se adaugă apoi 15 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2) la reziduu, apoi circa 120 ml de apă. Se amestecă cu bagheta de sticlă, care se lasă în paharul de laborator, și se acoperă paharul cu o sticlă de ceas. Se aduce încet la fierbere și se menține la punctul de fierbere până când cenușa se dizolvă complet. Se filtrează cu hârtie de filtru lipsită de cenușă și se colectează filtratul într-un balon gradat de 250 ml. Se spală paharul de laborator și se filtrează cu 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru fierbinte (3.2) și de două ori cu apă fiartă. Se umple balonul gradat cu apă până la semn (concentrația de HCl: circa 0,5 mol/litru).

- 5.1.1.2. Dacă reziduu din filtru este negru (cărbune), se reintroduce în cuptor și se calcinează din nou la 450-475 °C. Calcinarea, care necesită numai câteva ore (circa 3-5 ore), este completă când cenușa este albă sau aproape albă. Se dizolvă reziduu cu aproximativ 2 ml de acid clorhidric (3.1), se evaporă până la uscare și se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (3.2). Se încălzește, se filtrează soluția în balonul gradat și se umple cu apă până la semn (concentrația HCl: circa 0,5 mol/litru).

*Note:*

- (a) Este important ca atunci când se măsoară oligoelementele să se țină cont de riscul de contaminare, în special cu zinc, cupru și fier. Din acest motiv, echipamentul folosit în cursul preparării eșantioanelor trebuie să nu conțină aceste metale.

Pentru reducerea riscului general de contaminare, se lucrează într-o atmosferă fără praf, folosind un echipament curățat cu mare atenție și o sticlărie spălată cu grijă. Determinarea zincului este în mod special sensibilă la multe tipuri de contaminare, de exemplu prin intermediul sticlăriei, al reactivilor, al prafului etc.

- (b) Greutatea eșantionului care urmează să fie calcinat rezultă din cantitatea aproximativă de oligoelemente din furaje în raport cu sensibilitatea spectrofotometrului folosit. Pentru anumite tipuri de furaje, sărace în oligoelemente, poate fi necesar să se înceapă cu un eșantion de 10-20 g și să se completeze soluția finală numai până la 100 ml.
- (c) Arderea trebuie efectuată într-un cuptor închis fără injectare de aer sau de oxigen.
- (d) Temperatura indicată de pirometru nu trebuie să depășească 475 °C.

## 5.1.2. Determinarea spectrofotometrică

## 5.1.2.1. Pregătirea soluțiilor de calibrare

Pentru fiecare dintre elementele care urmează să fie determinate se prepară din soluțiile etalon de lucru de la punctele 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 și 3.10.1 o gamă de soluții de calibrare, fiecare soluție de calibrare având o concentrație de HCl de aproximativ 0,5 mol/litru și (în cazul fierului, manganului și zincului) o concentrație de clorură de lantan echivalentă cu 0,1 % La (g/v).

Concentrațiile de oligoelemente selectate trebuie să se situeze în intervalul sensibilității spectrofotometrului utilizat. Tabelele prezentate în continuare indică, de exemplu, compozițiile unor seturi tipice de soluții de calibrare; totuși, în funcție de tipul și sensibilitatea spectrofotometrului folosit, poate fi necesar să se selecteze alte concentrații.

**▼B****Fier**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de soluție etalon de lucru (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 de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml cu apă

**Cupru**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
ml de soluție etalon de lucru (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

**Mangan**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
ml de soluție etalon de lucru (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 de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml cu apă

**Zinc**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de soluție etalon de lucru (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 de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la 100 ml cu apă

**5.1.2.2. Prepararea soluției pentru analiză**

Pentru determinarea cuprului, soluția preparată la punctul 5.1.1 poate fi, în mod normal, folosită direct. Dacă este necesar să se obțină o concentrație situată în intervalul soluțiilor de calibrare, o parte alicotă poate fi pipetată într-un balon gradat de 100 ml și completată până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (3.3).

Pentru determinarea fierului, manganului și zincului, se pipetează o parte alicotă din soluția preparată la punctul 5.1.1 într-un balon gradat de 100 ml, se adaugă 10 ml de soluție de clorură de lantan (3.11) și se completează până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (3.3) (a se vedea și punctul 8, „Observații”).

**5.1.2.3. Experiment martor**

Experimentul martor trebuie să includă toate etapele prevăzute în procedură, cu excepția faptului că materialul de eșantion este omis. Soluția de calibrare „0” nu trebuie să fie folosită ca martor.

**5.1.2.4. Măsurarea absorbției atomice**

Se măsoară absorbția atomică a soluțiilor de calibrare și a soluției care urmează să fie analizată folosind o flacără aer-acetilenă oxidantă, la următoarele lungimi de undă:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

**▼ B**

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Fiecare măsurătoare se realizează de patru ori.

5.2. *Furaje minerale*

Dacă eșantionul nu conține materie organică, calcinarea prealabilă nu este necesară. Se procedează conform descrierii de la punctul 5.1.1.1, începând de la al doilea paragraf. Evaporarea cu acid fluorhidric poate fi omisă.

6. **Calculul rezultatelor**

Folosind o curbă de calibrare, se calculează concentrația de oligoelemente în soluția care urmează să fie analizată și se exprimă rezultatul în mg de oligoelemente per kg de eșantion (ppm).

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același laborant nu depășește:

- 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de oligoelement în cauză până la 50 mg/kg;
- 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 50 până la 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 100 până la 200 mg/kg;
- 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză mai mare de 200 mg/kg.

8. **Observație**

Prezența de cantități mari de fosfați ar putea interfera cu determinarea fierului, manganului și zincului. Astfel de interferențe trebuie să fie corectate adăugând soluție de clorură de lantan (3.11). Dacă, însă, în eșantion, raportul de greutate Ca + Mg/P este > 2, adăugarea soluției de clorură de lantan (3.11) la soluția de analizat și la soluțiile de calibrare poate fi omisă.

D. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HALOFUGINONĂ

*DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]chinazolin-4-(3H)-onă-hidrobromid*

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului de halofuginonă din furaje. Limita de cuantificare este de 1 mg/kg.

2. **Principiu**

După tratarea cu apă fierbinte, halofuginona se extrage ca bază liberă în acetat de etil și ulterior se separă ca hidrociorid, într-o soluție apoasă de acid. Extractul se purifică prin cromatografie prin schimb ionic. Conținutul de halofuginonă se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), prin utilizarea unui detector de raze UV.

3. **Reactivi**

- 3.1. Acetonitril, de calitate HPLC.
- 3.2. Rășină Amberlit XAD-2.
- 3.3. Acetat de amoniu.
- 3.4. Acetat de etil.
- 3.5. Acid acetic glacial.



**▼B**

- 3.6. Substanța etalon halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-hidroxi-2-piperidil]acetoni]chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid, E 764)
- 3.6.1. Soluție etalon stoc de halofuginonă, 100 µg/ml
- Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de halofuginonă (3.6) într-un balon gradat de 500 ml, apoi se dizolvă în soluție tampon de acetat de amoniu (3.18), se completează până la semn cu soluție tampon și se amestecă. Această soluție este stabilă timp de trei săptămâni, la 5 °C, dacă este depozitată la întuneric.
- 3.6.2. Soluții de calibrare
- Se transferă 1, 2, 3, 4 și 6 ml de soluție etalon stoc (3.6.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (3.21) și se amestecă. Soluțiile au concentrații de 1, 2, 3, 4 și 6 µg/ml de halofuginonă. Aceste soluții se prepară imediat înainte de utilizare.
- 3.7. Acid clorhidric ( $\rho_{20}$  aproximativ 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanol.
- 3.9. Nitrat de argint.
- 3.10. Ascorbat de sodiu.
- 3.11. Carbonat de sodiu.
- 3.12. Clorură de sodiu.
- 3.13. EDTA (acid etilendiaminotetraacetic, sare disodică).
- 3.14. Apă, de calitate HPLC.
- 3.15. Soluție de carbonat de sodiu,  $c = 10$  g/100 ml.
- 3.16. Soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu,  $c = 5$  g/100 ml
- Se dizolvă 50 g de carbonat de sodiu (3.11) în apă, se diluează până la 1 litru și se adaugă clorură de sodiu (3.12) până la saturarea soluției.
- 3.17. Acid clorhidric, aproximativ 0,1 mol/l
- Se diluează 10 ml de HCl (3.7) în apă până la 1 litru.
- 3.18. Soluție tampon de acetat de amoniu, aproximativ 0,25 mol/l
- Se dizolvă 19,3 g de acetat de amoniu (3.3) și 30 ml de acid acetic (3.5) în apă (3.14) și se diluează până la 1 litru.
- 3.19. Prepararea rășinii de Amberlit XAD-2
- Se spală cu apă o cantitate corespunzătoare de Amberlit (3.2), până la îndepărtarea tuturor ionilor de clor, după cum indică testul cu nitrat de argint (3.20) efectuat pe faza apoasă eliminată. Apoi se spală rășina cu 50 ml de metanol (3.8), se elimină metanolul și se depozitează rășina în metanol proaspăt.
- 3.20. Soluție de nitrat de argint, aproximativ 0,1 mol/l
- Se dizolvă 0,17 g de nitrat de argint (3.9) în 10 ml de apă.
- 3.21. Fază mobilă HPLC
- Se amestecă 500 ml de acetonitril (3.1) cu 300 ml soluție tampon de acetat de amoniu (3.18) și 1 200 ml de apă (3.14). Se aduce pH-ul la valoarea 4,3 folosind acid acetic (3.5). Se trece printr-un filtru de 0,22 µm (4.8) și se degazează soluția (de exemplu prin ultrasonare timp de 10 minute). Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este depozitată într-un recipient închis, la întuneric.

**▼ B****4. Aparatură**

- 4.1. Baie cu ultrasunete.
- 4.2. Evaporator rotativ cu generare de film.
- 4.3. Centrifugă.
- 4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu grup de diode
  - 4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 μm sau o coloană echivalentă.
- 4.5. Coloană de sticlă (300 mm × 10 mm) prevăzută cu filtru de sticlă sinterizată și cu robinet de închidere.
- 4.6. Filtre din fibră de sticlă, cu diametru de 150 mm.
- 4.7. Filtre cu membrană de 0,45 μm.
- 4.8. Filtre cu membrană de 0,22 μm.

**5. Procedură**

*Notă:* Halofuginona ca bază liberă este instabilă în soluții alcaline sau de acetat de etil. Ea nu trebuie să rămână în acetat de etil mai mult de 30 de minute.

**5.1. Aspecte generale**

- 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența halofuginonei și a substanțelor interferente.
- 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de halofuginonă, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 3 mg/kg se adaugă 300 μl din soluția etalon stoc (3.6.1) la 10 g de furaj martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (5.2).

*Notă:* Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează halofuginonă.

**5.2. Extracție**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 g, 10 g de eșantion preparat, într-un tub de centrifugă de 200 ml, se adaugă 0,5 g de ascorbat de sodiu (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) și 20 ml de apă, apoi se amestecă. Se plasează tubul într-o baie de apă timp de 5 minute (80 °C). După răcire la temperatura camerei se adaugă 20 ml soluție de carbonat de sodiu (3.15) și se amestecă. Se adaugă imediat 100 ml de acetat de etil (3.4) și se agită energic cu mâna timp de 15 secunde. Apoi tubul se așează într-o baie cu ultrasunete (4.1) timp de 3 minute și se slăbește dopul. Se centrifughează timp de 2 minute și se decantează faza de acetat de etil printr-un filtru de fibră de sticlă (4.6), într-o pâlnie de separare de 500 ml. Se repetă extracția eșantionului cu o a doua cantitate de 100 ml acetat de etil. Se spală extractele combinate timp de 1 minut cu 50 ml de soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu (3.16) și se îndepărtează stratul apos.

Se extrage stratul organic timp de 1 minut cu 50 ml de acid clorhidric (3.17). Se trece stratul inferior de acid printr-o pâlnie de separare de 250 ml. Se extrage din nou stratul organic timp de 1,5 minute, cu o altă cantitate de 50 ml acid clorhidric, apoi se combină cu primul extract. Se spală extractele de acid combinate prin agitare circulară timp de aproximativ 10 secunde cu 10 ml de acetat de etil (3.4).

**▼B**

Se transferă cantitativ stratul apos într-un balon cu fund rotund de 250 ml și se îndepărtează faza organică. Se evaporă din soluția acidă tot acetatul de etil rămas utilizând un evaporator rotativ cu generare de film (4.2). Temperatura băii de apă trebuie să nu depășească 40 °C. În condițiile unei presiuni de aproximativ 25 mbar întreaga cantitate de acetat de etil rezidual se îndepărtează în 5 minute la 38 °C.

### 5.3. *Curățare*

#### 5.3.1. Pregătirea coloanei de Amberlit

Pentru fiecare extract de eșantion se pregătește câte o coloană XAD-2. Se transferă 10 g de Amberlit preparat (3.19) într-o coloană de sticlă (4.5) cu metanol (3.8). Se adaugă un dop mic de vată de sticlă deasupra patului de rășină. Se scurge metanolul din coloană și se spală rășina cu 100 ml de apă, oprind fluxul pe măsură ce lichidul ajunge la partea superioară a patului de rășină. Se lasă coloana să se echilibreze timp de 10 minute înainte de utilizare. Niciodată nu se lasă coloana să se usuce.

#### 5.3.2. Curățarea eșantionului

Se transferă cantitativ extractul (5.2) în partea superioară a coloanei de Amberlit preparată (5.3.1) și se eluează, îndepărtând apoi eluatul. Rata de eluare nu trebuie să depășească 20 ml/minut. Se clătește balonul cu fund rotund cu 20 ml de acid clorhidric (3.17), apoi acesta se folosește pentru spălarea coloanei de rășină. Se suflă orice urmă de soluție acidă rămasă cu ajutorul unui curent de aer. Se îndepărtează lichidele de spălare. Se adaugă 100 ml de metanol (3.8) în coloană și se eluează 5-10 ml; se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se lasă metanolul rămas timp de 10 minute să se echilibreze cu rășina și se continuă eluarea la o rată care să nu depășească 20 ml/minut, colectând eluatul în același balon cu fundul rotund. Se evaporază metanolul pe evaporatorul rotativ cu generare de film (4.2); temperatura băii de apă trebuie să nu depășească 40 °C. Se transferă cantitativ reziduul într-un balon gradat de 10 ml, utilizând faza mobilă (3.21). Se completează până la semn cu ajutorul fazei mobile și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (5.4).

### 5.4. *Determinarea prin HPLC*

#### 5.4.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.4.1)

Fază mobilă HPLC (3.21)

Debit: 1,5-2 ml/minut

Lungimea unde de detecție: 243 nm

Volum de injecție: 40-100 µl.

Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (3.6.2) conținând 3 µg/ml, până la obținerea de înălțimi (sau de arii) ale vârfurilor și de timp de retenție constanți.

#### 5.4.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.6.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

**▼B**

## 5.4.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (5.3.2) de mai multe ori, utilizând același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de halofuginonă.

## 6. Calculul rezultatelor

Concentrația soluției de eșantion în  $\mu\text{g/ml}$  se determină plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor de halofuginonă a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.4.2).

Conținutul de halofuginonă  $w$  ( $\text{mg/kg}$ ) al eșantionului este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

unde:

$c$  = concentrația de halofuginonă din soluția de eșantion, în  $\mu\text{g/ml}$ ;  
 $m$  = greutatea porțiunii de testat, în grame.

## 7. Validarea rezultatelor

## 7.1. Identitatea

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode cu care se compară spectrul extractului de eșantion cu cel al soluției de calibrare (3.6.2), care conține 6  $\mu\text{g/ml}$ .

## 7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (3.6.2). Cantitatea de halofuginonă adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de halofuginonă găsită în extractul de eșantion.

După luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului, crește numai înălțimea vârfului de halofuginonă. Lărgimea vârfului, la jumătate din înălțimea sa maximă, trebuie să se încadreze într-o variație de  $\pm 10\%$  din lărgimea originală.

## 7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează după următoarele criterii:

- (a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și a etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este de obicei de  $\pm 2$  nm;
- (b) între 225 și 300 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;
- (c) între 225 și 300 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

**▼B**

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,5 mg/kg pentru un conținut de halofugiononă de până la 3 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru eșantionul martor îmbogățit se realizează o recuperare de minimum 80 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

A fost organizat un studiu colaborativ <sup>(1)</sup> în cadrul căruia trei eșantioane au fost analizate de opt laboratoare.

**Rezultate**

	Eșantionul A (martor) La primire	Eșantionul B (făină)		Eșantionul C (pelete)	
		La primire	După două luni	La primire	După două luni
Medie (mg/kg)	ND	2,8	2,42	2,89	2,45
S <sub>R</sub> (mg/kg)	—	0,45	0,43	0,4	0,42
CV <sub>R</sub> (%)	—	16	18	14	17
Rec. (%)		86	74	88	75

ND = nedetectat;

S<sub>R</sub> = deviația standard a reproductibilității;

CV<sub>R</sub> = coeficientul de variație a reproductibilității (%);

Rec. = recuperare (%).

**E. DETERMINAREA ROBENIDINEI**

*Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidin*

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului de robenidină din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg.

2. **Principiu**

Eșantionul se extrage cu metanol acidifiat. Extractul se usucă și o parte alicotă se curăță într-o coloană de oxid de aluminiu. Robenidina se eluează din coloană cu metanol, se concentrează și se completează până la un volum adecvat cu fază mobilă. Conținutul de robenidină se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

3. **Reactivi**

## 3.1. Metanol.

## 3.2. Metanol acidifiat

Se transferă 4 ml de acid clorhidric ( $\rho_{20} = 1,18$  g/ml) într-un balon gradat de 500 ml, se completează până la semn cu metanol (3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

<sup>(1)</sup> The Analyst 108, 1983, p. 1 252-1 256.

**▼B**

- 3.3. Acetonitril, de calitate HPLC.
- 3.4. Sită moleculară  
Tip 3A, 8-12 noduri ale sitei (noduri de 1,6-2,5 mm, aluminosilicat cristalin, diametrul porilor 0,3 mm).
- 3.5. Oxid de aluminiu, activitate acidă grad I pentru cromatografia pe coloană  
Se transferă 100 g de oxid de aluminiu într-un recipient adecvat și se adaugă 2 ml de apă. Se închide și se agită timp de aproximativ 20 de minute. Se păstrează într-un recipient bine închis.
- 3.6. Soluție de fosfat diacid de potasiu,  $c = 0,025$  mol/l  
Se dizolvă 3,4 g de fosfat diacid de potasiu în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn și se amestecă.
- 3.7. Soluție de fosfat acid disodic,  $c = 0,025$  mol/l  
Se dizolvă 3,55 g de fosfat acid disodic anhidru (sau 4,45 g de dihidrat sau 8,95 g de dodecahidrat) în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 litru, se completează până la semn și se amestecă.
- 3.8. Fază mobilă HPLC  
Se amestecă următorii reactivi:  
650 ml de acetonitril (3.3),  
250 ml apă (de calitate HPLC),  
50 ml soluție de fosfat diacid de potasiu (3.6),  
50 ml soluție de fosfat acid disodic (3.7).  
Se trece printr-un filtru de 0,22  $\mu\text{m}$  (4.6) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute).
- 3.9. Substanța etalon  
Robenidină pură: clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorobenziliden)amino]guanidin.
- 3.9.1. Soluția etalon stoc de robenidină: 300  $\mu\text{g/ml}$   
Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 30 mg de substanță etalon de robenidină (3.9). Se dizolvă în metanol acidifiat (3.2) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.
- 3.9.2. Soluție etalon intermediară de robenidină: 12  $\mu\text{g/ml}$   
Se transferă 10 ml din soluția etalon stoc (3.9.1) într-un balon gradat de 250 ml, se completează până la semn cu faza mobilă (3.8) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.
- 3.9.3. Soluții de calibrare  
Se transferă 5, 10, 15, 20 și 25 ml de soluție etalon intermediară (3.9.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 și 6  $\mu\text{g/ml}$  de robenidină. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate.
- 3.10. Apă de calitate HPLC.

**▼B****4. Aparatură**

## 4.1. Coloană de sticlă

Construită din sticlă brună, prevăzută cu robinet de închidere și un rezervor cu capacitatea de aproximativ 150 ml, diametru interior 10-15 mm, lungime 250 mm.

## 4.2. Agitator mecanic sau magnetic.

## 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film.

## 4.4. Echipament HPLC cu detector de radiații UV cu lungimi de undă variabile sau cu detector cu grup de diode care funcționează în intervalul 250-400 nm

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 μm sau echivalent.

## 4.5. Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă).

## 4.6. Filtre cu membrană, 0,22 μm.

## 4.7. Filtre cu membrană, 0,45 μm.

**5. Procedură**

*Notă:* Robenidina este sensibilă la lumină. Pentru toate operațiile se folosește sticla brună.

5.1. *Aspecte generale*

## 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența robenidinei și a substanțelor interferente.

## 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor (5.1.1) care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de robenidină, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 60 mg/kg, se transferă 3 ml din soluția etalon stoc (3.9.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se evaporă soluția până la cca 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 15 g din furajul martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (5.2).

*Notă:* Pentru această metodă, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează robenidină.

5.2. *Extracție*

Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 15 g de eșantion preparat. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se adaugă 100 ml metanol acidifiat (3.2), se închide și se agită timp de 1 oră în agitator (4.2). Se filtrează soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.5) și se colectează întregul filtrat într-un flacon tip Erlenmeyer de 150 ml. Se adaugă 7,5 g de sită moleculară (3.4), se închide și se agită timp de 5 minute. Se filtrează imediat prin hârtie de filtru din fibră de sticlă. Se conservă această soluție pentru etapa de purificare (5.3).

5.3. *Purificare*

## 5.3.1. Pregătirea coloanei de oxid de aluminiu

Se introduce un tampon mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (4.1) și se împinge utilizând o baghetă de sticlă. Se cântăresc 11 g din oxidul de aluminiu preparat (3.5) și se transferă în coloană. Pe parcursul acestei etape este important ca expunerea la aer să fie redusă la minimum. Se lovește ușor coloana încărcată în partea inferioară pentru a permite stabilizarea oxidului de aluminiu.

**▼B****5.3.2. Purificarea eșantionului**

Se transferă în coloană cu pipeta 5 ml de extract de eșantionul preparat în (5.2). Vârful pipetei se menține aproape de peretele coloanei și se permite ca soluția să fie absorbită de oxidul de aluminiu. Se eluează robenidina din coloană folosind 100 ml metanol (3.1), cu un debit de 2-3 ml/minut și se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se evaporă soluția de metanol până la uscare sub presiune redusă la 40 °C, prin intermediul unui evaporator rotativ cu generare de film (4.3). Se redizolvă reziduu în 3-4 ml de fază mobilă (3.8) și se transferă cantitativ într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul de mai multe ori cu cantități de 1-2 ml de fază mobilă și se transferă lichidul de clătire în balonul gradat. Se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (5.4).

**5.4. Determinarea prin HPLC****5.4.1. Parametri**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.4.1).

Fază mobilă HPLC (3.8).

Debit: 1,5-2 ml/minut.

Lungimea de undă a detectorului: 317 nm.

Volum de injecție: 20-50 μl.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (3.9.3) care conține 3,6 μg/ml, până la obținerea de valori de vârf și de timp de retenție constante.

**5.4.2. Curba de calibrare**

Fiecare soluție de calibrare (3.9.3) se injectează de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile sau ariile medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

**5.4.3. Soluția de eșantion**

Se injectează de mai multe ori extractul de eșantion (5.3.2) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de robenidină.

**6. Calculul rezultatelor**

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor robenidinei din soluția de eșantion se determină concentrația în μg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.4.2).

Conținutul de robenidină  $w$  (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

unde:

$c$  = concentrația de robenidină din soluția de eșantion, în μg/ml;

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în grame.



**▼ B****7. Validarea rezultatelor****7.1. Identitate**

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin folosirea unui detector cu grup de diode, prin intermediul căruia se compară spectrul extractului de eşantion și cel al soluției de calibrare (3.9.3) conținând 6 µg/ml.

**7.1.1. Co-cromatografie**

Un extract de eşantion se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (3.9.3). Cantitatea de robenidină adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de robenidină constatată în extractul de eşantion.

Numai înălțimea vârfului de robenidină crește după luarea în considerare a cantității adăugate și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială.

**7.1.2. Detecție cu grup de diode**

Rezultatele se evaluează după următoarele criterii:

- (a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eşantionului și a etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detectarea cu grup de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;
- (b) între 225 și 400 nm, spectrele eşantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;
- (c) între 225 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eşantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

**7.2. Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de robenidină mai mare de 15 mg/kg.

**7.3. Recuperare**

Pentru un eşantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 85 %.

**8. Rezultatele unui studiu colaborativ**

A fost organizat un studiu prin colaborare la nivelul CE, în cursul căruia au fost analizate de către 12 laboratoare patru eşantioane, sub formă de făină sau de pelete, de hrană pentru păsări de crescătorie și pentru iepuri. Fiecare eşantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

**▼ B**

	Păsări de crescătorie		Iepuri	
	Făină	Pelete	Făină	Pelete
Medie (mg/kg)	27	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	10,6	9,7
Recuperare (%)	90	93,3	87,2	80,2

$s_r$  = deviația standard a repetabilității;

$CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității, %;

$S_R$  = deviația standard a reproductibilității;

$CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității, %.

#### F. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE DICLAZURIL

*(+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)fenil]-acetonitril*

##### 1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de diclazuril din furaje și premixuri. Limita de detecție este de 0,1 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 0,5 mg/kg.

##### 2. Principiu

După adăugarea unui standard intern, eșantionul este extras cu metanol acidifiat. Pentru furaje, o parte alicotă a extractului este purificată pe un cartuș  $C_{18}$  pentru extracție în fază solidă. Diclazurilul este eluat din cartuș cu un amestec de metanol acidifiat și apă. După evaporare, reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Pentru premixuri, extractul se evaporă și reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Conținutul de diclazuril se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu gradient ternar și cu fază inversată, prin utilizarea unui detector UV.

##### 3. Reactivi

- 3.1. Apă, de calitate HPLC.
- 3.2. Acetat de amoniu.
- 3.3. Sulfat acid de tetrabutilamoniu (TBHS).
- 3.4. Acetonitril, de calitate HPLC.
- 3.5. Metanol, de calitate HPLC.
- 3.6. N,N-dimetilformamidă (DMF).
- 3.7. Acid clorhidric,  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml.
- 3.8. Substanță etalon: diclazuril II-24: (+)-4-clorfenil [2,6 diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril, cu puritate garantată, E771
  - 3.8.1. Soluție etalon stoc de diclazuril, 500  $\mu\text{g/ml}$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de diclazuril (3.8) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (3.6), se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură  $\leq 4$  °C, soluția este stabilă timp de o lună.

**▼B**

## 3.8.2. Soluția etalon de diclazuril, 50 µg/ml

Se transferă 5 ml din soluția etalon stoc (3.8.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură  $\leq 4$  °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.9. Substanță etalon internă: 2,6 diclor- $\alpha$ -(4-clorfenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazină-2 (3H)-il] $\alpha$ -metilbenzen-acetonitril

## 3.9.1. Soluție etalon stoc internă de diclazuril, 500 µg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon internă (3.9) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (3.6), se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură  $\leq 4$  °C, soluția este stabilă timp de o lună.

## 3.9.2. Soluție etalon internă, 50 µg/ml

Se transferă 5 ml din soluția etalon stoc internă de etalon intern (3.9.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură  $\leq 4$  °C, soluția este stabilă timp de o lună.

## 3.9.3. Soluție etalon internă pentru premixuri, p/1000 mg/ml

(p = conținut nominal în diclazuril al premixului în mg/kg)

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, p/10 mg de substanță etalon internă într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în DMF (3.6) într-o baie cu ultrasunete (4.6), se completează până la semn cu DMF și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură  $\leq 4$  °C, soluția este stabilă timp de o lună.

## 3.10. Soluție de calibrare, 2 µg/ml

Se pipetează 2 ml din soluția etalon de diclazuril (3.8.2) și 2 ml din soluția etalon internă (3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 16 ml de DMF (3.6), se completează până la semn cu apă și se amestecă. Soluția trebuie preparată imediat înainte de utilizare.

3.11. Cartuș C<sub>18</sub> pentru extracție în fază solidă, de exemplu Bond Elut, mărime: 1 cc, greutatea absorbentului: 100 mg.

## 3.12. Solvent de extracție: metanol acidifiat

Se pipetează 5 ml de acid clorhidric (3.7) în 1 000 ml de metanol (3.5) și se amestecă.

## 3.13. Fază mobilă pentru HPLC

## 3.13.1. Eluent A: acetat de amoniu – soluție de sulfat acid de tetrabutilamoniu.

Se dizolvă 5 g de acetat de amoniu (3.2) și 3,4 g de TBHS (3.3) în 1 000 ml de apă (3.1) și se amestecă.

## 3.13.2. Eluent B: acetonitril (3.4).

## 3.13.3. Eluent C: metanol (3.5).

**▼B****4. Aparatură**

- 4.1. Agitator mecanic.
- 4.2. Echipament pentru HPLC cu gradient ternar
  - 4.2.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, Hypersil ODS, particule de 3 µm, 100 mm × 4,6 mm sau echivalent.
  - 4.2.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode.
- 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film.
- 4.4. Filtru cu membrană, 0,45 µm.
- 4.5. Distribuitor în vid.
- 4.6. Baie cu ultrasunete.

**5. Procedură****5.1. Aspecte generale****5.1.1. Furaj martor**

Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența diclazurilului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eşantionul, iar prin analiză nu se detectează nici diclazuril, nici substanțe interferente.

**5.1.2. Test de recuperare**

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de diclazuril, similară cu cea prezentă în eşantion. Pentru a obține o concentrație de 1 mg/kg, se adaugă 0,1 ml din soluția etalon stoc (3.8.1) la 50 g din furajul martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a continua (5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eşantionul (a se vedea 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat prin metoda standard de adăugare a etalonului. În acest caz, eşantionul de analizat se îmbogățește adăugând o cantitate de diclazuril similară celei deja prezente în eşantion. Acest eşantion este analizat împreună cu eşantionul neîmbogățit, iar recuperarea poate fi calculată prin scădere.

**5.2. Extracție****5.2.1. Furaje**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 50 g de eşantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1 ml din soluția etalon internă (3.9.2), 200 ml din solventul de extracție (3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 20 ml din supernatant într-un recipient de sticlă adecvat și se diluează în 20 ml apă. Se transferă această soluție într-un cartuș de extracție (3.11) și se trece prin acesta prin aplicare de vid (4.5). Se spală cartușul cu 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (3.12) și apă, 65 + 35 (V + V). Se elimină fracțiunile colectate și se eluează compușii cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (3.12) și apă, 80 + 20 (V + V). Se evaporă această fracțiune până la uscare prin intermediul evaporatorului rotativ (3.1) la 60 °C. Se dizolvă rezidul în 1 ml DMF (3.6), se adaugă 1,5 ml de apă (3.1) și se amestecă. Se filtrează cu un filtru cu membrană (4.4). Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

**5.2.2. Premixuri**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, aproximativ 1 g de eşantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1 ml din soluția etalon internă (3.9.3) și 200 ml din solventul de extracție (3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (4.1) pe parcursul

**▼ B**

noapții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000/p ml (p = conținutul nominal în diclazuril al premixului în mg/kg) din supernatant într-un balon cu fund rotund de dimensiuni adecvate. Se evaporă acest amestec până la uscare, la presiune scăzută și la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator rotativ (4.3). Se dizolvă din nou reziduul în 10 ml de DMF (3.6), se adaugă 15 ml de apă (3.1) și se amestecă. Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

5.3. *Determinarea prin HPLC*5.3.1. *Parametri*

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm Hypersil ODS, particule de 3 μm sau echivalent
Fază mobilă:	Eluent A (3.13.1): Soluție apoasă de acetat de amoniu și sulfat acid de tetrabutylamoniu Eluent B (3.13.2): acetonitril Eluent C (3.13.3): metanol
Mod de eluție:	— gradient linear — condiții inițiale: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — după 10 min, eluția prin gradient timp de 30 min la: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Se clătește cu B timp de 10 minute.
Debit:	1,5-2 ml/minut
Volum de injecție:	20 μl
Lungimea de undă a detectorului:	280 nm

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (3.10) care conține 2 μg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. *Soluția de calibrare*

Se injectează 20 μl din soluția de calibrare (3.10) de mai multe ori și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de diclazuril și a vârfurilor etalonului intern.

5.3.3. *Soluția de eșantion*

Se injectează 20 μl din soluția de eșantion (5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori și se determină înălțimea (aria) medie a vârfului de diclazuril și a vârfurilor etalonului intern.

6. **Calculul rezultatelor**6.1. *Furaje*

Conținutul în diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} [\text{mg/kg}]$$

**▼B**

unde:

$h_{d,s}$  = înălțimea (aria) vârfului de diclazuril din soluția de eșantion (5.2.1);

$h_{i,s}$  = înălțimea (aria) vârfului etalonului intern din soluția de eșantion (5.2.1);

$h_{d,c}$  = înălțimea (aria) vârfului de diclazuril din soluția de calibrare (3.10);

$h_{i,c}$  = înălțimea (aria) vârfului etalonului intern din soluția de calibrare (3.10);

$c_{d,c}$  = concentrația de diclazuril din soluția de calibrare în  $\mu\text{g/ml}$  (3.10);

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g;

$V$  = volumul extractului de eșantion conform 5.2.1 (adică 2,5 ml).

## 6.2. Premixuri

Conținutul în diclazuril  $w$  (în  $\text{mg/kg}$ ) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02 V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

unde:

$h_{d,c}$  = înălțimea (aria) vârfului de diclazuril din soluția de calibrare (3.10);

$h_{i,c}$  = înălțimea (aria) vârfului etalonului intern din soluția de calibrare (3.10);

$h_{d,s}$  = înălțimea (aria) vârfului de diclazuril din soluția de eșantion (5.2.2);

$h_{i,s}$  = înălțimea (aria) vârfului etalonului intern din soluția de eșantion (5.2.2);

$c_{d,c}$  = concentrația în diclazuril a soluției de calibrare în  $\mu\text{g/ml}$  (3.10);

$m$  = greutatea porțiunii de test, în g;

$V$  = volumul extractului de eșantion conform 5.2.2 (adică 25 ml);

$p$  = conținutul nominal de diclazuril al premixului în  $\text{mg/kg}$ .

## 7. Validarea rezultatelor

### 7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (5.2.1 sau 5.2.2) și ale soluției de calibrare (3.10).

#### 7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități adecvate din soluția de calibrare (3.10). Cantitatea de diclazuril adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de diclazuril constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de diclazuril și a vârfului etalonului intern crește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze în  $\pm 10\%$  din lărgimea inițială a vârfului de diclazuril sau a vârfului etalonului intern al extractului de eșantion neîmbogățit.

#### 7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de  $\pm 2\text{ nm}$ ;

**▼B**

- (b) între 230 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța analitului etalon;
- (c) între 230 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

- 30 % din valoarea superioară pentru un conținut în diclazuril situat între 0,5 și 2,5 mg/kg;
- 0,75 mg/kg pentru un conținut în diclazuril situat între 2,5 și 5 mg/kg;
- 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de diclazuril mai mare de 5 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate cinci eșantioane de către 11 laboratoare. Aceste eșantioane au constat din două premixuri; unul a fost amestecat cu o matrice organică (O 100), iar celălalt cu o matrice anorganică (A 100). Conținutul teoretic este de 100 mg de diclazuril pe kg. Cele trei furaje amestecate pentru păsări de crescătorie erau fabricate de trei producători diferiți (NL) (L1/Z1/K1). Conținutul teoretic este de 1 mg de diclazuril pe kg. Laboratoarele au primit instrucțiuni să analizeze fiecare eșantion o singură dată sau în duplicat. (Informații detaliate privind acest studiu colaborativ figurează în *Journal of AOAC International*, vol. 77, nr. 6, 1994, p. 1 359-1 361). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos.

	Eșantion 1 A 100	Eșantion 2 O 100	Eșantion 3 L1	Eșantion 4 Z1	Eșantion 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Medie	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
Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = număr de laboratoare;

n = număr de valori unice;

$s_r$  = deviație standard a repetabilității;

$CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității;

**▼ B**

$S_R$  = deviație standard a reproductibilității;

$CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității.

9. **Observație**

Trebuie să se demonstreze în prealabil că reacția diclazurilului este liniară pentru toată gama de concentrații măsurate.

G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE LASALOCID SODIC

*Sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de Streptomyces lasaliensis*

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului în lasalocid sodic din furaje și premixuri. Limita de detecție este de 5 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 10 mg/kg.

2. **Principiu**

Lasalocidul sodic este extras din eșantion cu metanol acidifiat și dozat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector spectrofluorimetric.

3. **Reactivi**

3.1. Fosfat diacid de potasiu ( $KH_2PO_4$ ).

3.2. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 %.

3.3. Soluție de acid ortofosforic, c = 20 %.

Se diluează 23,5 ml acid ortofosforic (3.2) în 100 ml de apă.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilhexilamină), g (g/g) = 99 %.

3.5. Metanol, de calitate HPLC.

3.6. Acid clorhidric, densitate = 1,19 g/ml.

3.7. Soluție tampon de fosfat, c = 0,01 mol/l

Se dizolvă 1,36 g de  $KH_2PO_4$  (3.1) în 500 ml de apă (3.11), se adaugă 3,5 ml de acid ortofosforic (3.2) și 10 ml de 6-metil-2-heptilamină (3.4). Se ajustează pH-ul la 4 cu ajutorul soluției de acid ortofosforic (3.3) și se diluează cu apă completându-se până la 1 000 ml (3.11).

3.8. Metanol acidifiat

Se transferă 5 ml de acid clorhidric (3.6) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu metanol (3.5) și se amestecă. Soluția trebuie preparată imediat înainte de utilizare.

3.9. Fază mobilă HPLC, soluție tampon de fosfat și metanol 5 + 95 (V + V)

Se amestecă 5 ml de soluție tampon de fosfat (3.7) cu 95 ml de metanol (3.5).

3.10. Substanță etalon de lasalocid sodic cu puritate garantată,  $C_{34}H_{53}O_8Na$  (sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de *Streptomyces lasaliensis*), E 763

3.10.1. Soluție etalon stoc de lasalocid sodic, 500  $\mu g/ml$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sodic (3.10) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în metanol acidifiat (3.8), se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.



**▼B****3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid sodic, 50 µg/ml**

Se pipetează 10 ml din soluția etalon stoc (3.10.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu metanol acidifiat (3.8) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

**3.10.3. Soluții de calibrare**

Se transferă 1, 2, 4, 5 și 10 ml de soluție etalon intermediară (3.10.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1, 2, 4, 5 și 10 µg de lasalocid sodic pe ml. Ele se prepară imediat înainte de utilizare.

**3.11. Apă, de calitate HPLC.****4. Aparatură****4.1. Baie cu ultrasunete (sau baie de apă cu agitare) cu reglaj de temperatură****4.2. Filtre cu membrană, 0,45 µm****4.3. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 20 µl****4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă de 125 mm × 4 mm, fază inversată C<sub>18</sub>, particule de 5 µm sau echivalent****4.3.2. Spectrofluorimetru cu ajustare variabilă a lungimii de undă pentru excitație și emisie****5. Procedură****5.1. Aspecte generale****5.1.1. Furaj martor**

Pentru a efectua testul de recuperare (5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența lasalocidului sodic și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu se detectează nici lasalocid sodic, nici substanțe interferente.

**5.1.2. Test de recuperare**

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de lasalocid sodic, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10 ml de soluție etalon stoc (3.10.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (vezi 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat prin metoda standard de adăugare a etalonului. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de lasalocid sodic asemănătoare celei deja prezente în eșantion. Acesta este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea se poate calcula prin diferență.

**5.2. Extracție****5.2.1. Furaie**

Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, de la 5 la 10 g de eșantion într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml cu dop. Se picură cu pipeta 100 ml de metanol acidifiat (3.8). Se închide ușor și se agită circular pentru a se dispersa. Flaconul se plasează într-o baie cu ultrasunete (4.1) la

**▼B**

aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se lasă în repaus timp de aproximativ o oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (4.2) într-un recipient adecvat. Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

5.2.2. **Premixuri**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 2 g de premix nemăcinat într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 100 ml de metanol acidifiat (3.8) și se agită circular pentru a se dispersa. Se pune balonul și conținutul acestuia într-o baie cu ultrasunete (4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, apoi se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (3.8) și se amestecă bine. Se lasă în repaus timp de aproximativ o oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (4.2). Se diluează un volum adecvat de filtrat limpede cu metanol acidifiat (3.8), pentru a produce o soluție de testat finală care să conțină aproximativ 4 μg/ml de lasalocid sodic. Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

5.3. **Determinarea prin HPLC**5.3.1. **Parametri**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.3.1)	125 mm × 4 mm, fază inversată C <sub>18</sub> , particule de 5 μm sau echivalent
Fază mobilă (3.9):	amestec de soluție tampon de fosfat (3.7) și metanol (3.5), 5 + 95 (V + V)
Debit:	1,2 ml/minut
Lungimea undelor de detecție:	
Excitație:	310 nm
Emisie:	419 nm
Volum de injecție:	20 μl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (3.10.3) conținând 4 μg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.3.2. **Curba de calibrare**

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.10.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând valorile (ariile) medii ale vârfurilor ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

5.3.3. **Soluția de eșantion**

Se injectează extractul de eșantion (5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori utilizând același volum cu cel reținut pentru soluția de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de lasalocid sodic.

6. **Calculul rezultatelor**

Plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor soluției de eșantion (5.3.3), se determină concentrația de lasalocid sodic (μg/ml) prin referire la curba de calibrare.

**▼ B**6.1. *Furaje*

Conținutul de lasalocid sodic  $w$  (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

unde:

$c$  = concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (5.2.1) în  $\mu\text{g/ml}$ ;

$V_1$  = volumul extractului de eșantion conform 5.2.1 în ml (adică 100);

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g.

6.2. *Premixuri*

Conținutul de lasalocid sodic  $w$  (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

unde:

$c$  = concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (5.2.2), în  $\mu\text{g/ml}$ ;

$V_2$  = volumul extractului de eșantion conform 5.2.2, în ml (adică 250);

$f$  = factorul de diluție conform 5.2.2;

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g.

7. **Validarea rezultatelor**7.1. *Identitate*

Metodele bazate pe spectrofluorimetrie sunt mai puțin supuse interferențelor decât cele care utilizează un detector UV. Identitatea analitului poate fi confirmată de către co-cromatografie.

7.1.1. *Co-cromatografie*

Un extract de eșantion (5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (3.10.3). Cantitatea de lasalocid sodic adăugată trebuie să fie asemănătoare cantității de lasalocid sodic constatată în extractul de eșantion. Numai înălțimea vârfului corespunzător lasalocidului sodic se mărește după ce s-a luat în calcul cantitatea de lasalocid sodic adăugată și diluția extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii, trebuie să se încadreze între  $\pm 10\%$  din lărgimea inițială a vârfului produs de extractul de eșantion neîmbogățit.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 30 și 100 mg/kg;

— 15 mg/kg pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 100 și 200 mg/kg;

— 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic mai mare de 200 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion de furaj (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. Pentru eșantioanele de premixuri îmbogățite, recuperarea este de cel puțin 90 %.

**▼B****8. Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a realizat un studiu colaborativ (\*) în cursul căruia au fost analizate 2 premixuri (eșantioanele 1 și 2) și 5 furaje (eșantioanele 3-7) de către 12 laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele studiului sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion 1 Premix pentru pui	Eșantion 2 Premix pentru curcani	Eșantion 3 Pelete pentru curcani	Eșantion 4 Sfărâ- mături pentru pui	Eșantion 5 Hrană pentru curcani	Eșantion 6 Hrană A pentru pui	Eșantion 7 Hrană B pentru pui
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Medie (mg/ kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s <sub>r</sub> (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV <sub>r</sub> (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4	5,37
S <sub>R</sub> (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV <sub>R</sub> (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,7
Conținut nominal (mg/kg)	5 000 (- *)	16 000 (- *)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(\*) Conținutul declarat de producător.

(\*\*) Furaj preparat în laborator.

L = număr de laboratoare;

n = număr de valori unice;

s<sub>r</sub> = deviație standard a repetabilității;

S<sub>R</sub> = deviație standard a reproductibilității;

CV<sub>r</sub> = coeficientul de variație a repetabilității, %;

CV<sub>R</sub> = coeficientul de variație a reproductibilității, %.



## ANEXA V

METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL SUBSTANȚELOR  
NEDORITE DIN FURAJEA. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE GOSIPOL LIBER ȘI  
TOTAL1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea nivelurilor de gosipol liber, de gosipol total și de substanțe chimic înrudite cu acesta din sămânță de bumbac, făină de sămânță de bumbac și brichete de sămânță de bumbac și din furaje combinate care conțin aceste materii prime furajere, atunci când gosipolul liber, gosipolul total și substanțele chimic înrudite cu acesta sunt prezente în concentrație mai mare de 20 mg/kg.

2. **Principiu**

Gosipolul se extrage în prezența a 3-aminopropan-1-ol, fie cu un amestec de propan-2-ol și hexan, pentru determinarea gosipolului liber, fie cu dimetilformamidă, pentru determinarea gosipolului total. Gosipolul este convertit de anilină în gosipol-dianilină, a cărei densitate optică se măsoară la lungimea de undă de 440 nm.

3. **Reactivi**

3.1. Amestec de propan-2-ol-hexan: se amestecă 60 de părți volumetrice de propan-2-ol cu 40 de părți volumetrice de *n*-hexan.

3.2. Solvent A: Se plasează într-un balon gradat de 1 litru aproximativ 500 ml de amestec de propan-2-ol-hexan (3.1), 2 ml de 3-aminopropan-1-ol, 8 ml de acid acetic glacial și 50 ml de apă. Se aduce la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (3.1). Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.3. Solvent B: Se pipetează 2 ml de 3-aminopropan-1-ol și 10 ml de acid acetic glacial într-un balon gradat de 100 ml. Se răcește la temperatura camerei și se aduce la volum cu N, N-dimetilformamidă. Acest reactiv este stabil timp de o săptămână.

3.4. Anilină: Dacă densitatea optică a testului martor depășește 0,022, se distilează anilina peste praf de zinc, îndepărtând primele și ultimele fracțiuni de 10 % de distilat. Răcit în frigider și depozitat într-un vas din sticlă brună cu dop, acest reactiv se păstrează timp de câteva luni.

3.5. Soluție etalon de gosipol A: Se plasează 27,9 mg de acetat de gosipol într-un balon gradat de 250 ml. Se dizolvă și se aduce la volum cu solvent A (3.2). Se pipetează 50 ml din această soluție într-un balon gradat de 250 ml și se completează până la volum cu solvent A. Concentrația de gosipol a acestei soluții este de 0,02 mg/ml. Se lasă să stea timp de o oră la temperatura camerei înainte de utilizare.

3.6. Soluție etalon de gosipol B: Se plasează 27,9 mg de acetat de gosipol într-un balon gradat de 50 ml, se dizolvă și se aduce la volum cu solvent B (3.3). Concentrația de gosipol a acestei soluții este de 0,5 mg/ml.

Soluțiile etalon de gosipol A și B rămân stabile timp de 24 de ore dacă sunt protejate de lumină.

4. **Aparatură**

4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35 rpm.

**▼B**

4.2. Spectrofotometru.

5. **Procedură**

5.1. *Eșantion de testat*

Cantitatea de eșantion de testat folosită depinde de conținutul estimat de gosipol al eșantionului. Este preferabil să se lucreze cu un eșantion de testat mic și cu o parte alicotă de filtrat relativ mare, pentru a obține suficient gosipol pentru a permite măsurarea fotometrică precisă. *Pentru determinarea gosipolului liber* din sămânță de bumbac, făină de sămânță de bumbac și din brichetele de sămânță de bumbac, eșantionul de testat nu depășește 1 g; pentru furajele combinate, aceasta poate fi de maximum 5 g. O parte alicotă de 10 ml de filtrat este suficientă în majoritatea cazurilor; aceasta conține între 50 și 100 μg de gosipol. *Pentru determinarea gosipolului total*, eșantionul de testat este între 0,5 și 5 g, pentru ca o parte alicotă de 2 ml de filtrat să conțină între 40 și 200 μg de gosipol.

*Analiza se efectuează la o temperatură a camerei de aproximativ 20 °C.*

5.2. *Determinarea gosipolului liber*

Se plasează eșantionul de testat într-un balon cu gât șlefuit de 250 ml, fundul balonului fiind acoperit cu sticlă pisată. Utilizând o pipetă, se adaugă 50 ml de solvent A (3.2), se astupă balonul și se amestecă timp de o oră în mixer. Se filtrează printr-un filtru uscat și se colectează filtratul într-un balon mic cu gât șlefuit. În timpul filtrării, se acoperă pâlnia cu o sticlă de ceas.

Se pipetează părți alicote identice de filtrat conținând 50-100 μg de gosipol în fiecare din cele două baloane gradate de 25 ml (A și B). Dacă este necesar, se aduce la volum până la 10 ml cu solvent A (3.2). Apoi se completează conținutul balonului (A) până la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (3.1). Această soluție va fi folosită ca soluție de referință față de care se măsoară soluția de eșantion.

Se pipetează 10 ml de solvent A (3.2) în fiecare din celelalte două baloane gradate de 25 ml (C și D). Se completează conținutul balonului (C) până la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (3.1). Această soluție va fi utilizată ca soluție de referință față de care se măsoară soluția de testului martor.

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) în fiecare din baloanele (D) și (B). Se încălzesc timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă în fierbere, pentru a apărea culoarea. Se răcesc la temperatura camerei, se aduc la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră.

Se determină densitatea optică a soluției testului martor (D) prin comparație cu soluția de referință (C), precum și densitatea optică a soluției de eșantion (B) prin comparație cu soluția de referință (A), în spectrofotometru la 440 nm folosind celule de sticlă de 1 cm.

Se scade densitatea optică a soluției testului martor din cea a soluției de eșantion (= densitatea optică corectată). Din această valoare se calculează conținutul în gosipol liber, conform indicațiilor de la punctul 6.

5.3. *Determinarea gosipolului total*

Se plasează un eșantion de testat conținând 1-5 mg de gosipol într-un balon gradat de 50 ml și se adaugă 10 ml de solvent B (3.3). În același timp, se prepară un test martor, plasându-se 10 ml de solvent B (3.3) în alt balon gradat de 50 ml. Se încălzesc cele două baloane timp de 30 de

**▼B**

minute deasupra unei băi de apă în fierbere. Se răcesc la temperatura camerei și se completează conținutul fiecărui balon până la volum cu amestec de propan-2-ol-hexan (3.1). Se omogenizează și se lasă să se depună timp de 10-15 minute, apoi se filtrează și se colectează filtratele în baloane cu gât șlefuit.

Se pipetează 2 ml de filtrat de eșantion în fiecare din cele două baloane gradate de 25 ml, și 2 ml de filtrat al testului martor în fiecare din celelalte două baloane de 25 ml. Se completează conținutul unui balon din fiecare serie până la 25 ml cu amestecul de propan-2-ol-hexan (3.1). Aceste soluții sunt utilizate ca soluții de referință.

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) în fiecare dintre celelalte două baloane. Se încălzesc timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă în fierbere, pentru a apărea culoarea. Se răcesc la temperatura camerei, se aduc la volumul de 25 ml cu amestecul de propan-2-ol-hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră.

Se determină densitatea optică, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.2 pentru gosipolul liber. Din această valoare se calculează conținutul de gosipol total, în conformitate cu indicațiile de la punctul 6.

## 6. Calculul rezultatelor

Rezultatele pot fi calculate fie pe baza densității optice specifice (6.1), fie prin referire la o curbă de calibrare (6.2).

### 6.1. Cu ajutorul densității optice specifice

Densitățile optice specifice, în condițiile descrise, sunt următoarele:

$$\text{Gosipolul liber } E_{\frac{1\%}{1\text{ cm}}} = 625$$

$$\text{Gosipolul total } E_{\frac{1\%}{1\text{ cm}}} = 600$$

Conținutul de gosipol liber sau de gosipol total al eșantionului este calculat folosind următoarea formulă:

$$\% \text{ gosipol } : \frac{E \times 1\,250}{E_{\frac{1\%}{1\text{ cm}}} \times p \times a}$$

unde:

E = densitatea optică corectată, determinată conform indicațiilor de la punctul 5.2;

p = eșantion de testat, în g;

a = partea alicotă a filtratului, în ml.

### 6.2. Cu ajutorul curbei de calibrare

#### 6.2.1. Gosipolul liber

Se prepară 2 serii de cinci baloane gradate de 25 ml. Se pipetează părți alicote de 2, 4, 6, 8 și 10 ml de soluție etalon de gosipol A (3.5) în fiecare serie de baloane. Se aduc la volum până la 10 ml cu solventul A (3.2). Se completează fiecare serie cu o balon gradat de 25 ml conținând numai 10 ml de solvent A (3.2) (testul martor).

Se aduc la volum baloanele din prima serie (inclusiv balonul testului martor) până la 25 ml cu un amestec de propan-2-ol-hexan (3.1) (serii de referință).

**▼B**

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare din baloanele din a doua serie (inclusiv balonul testului martor). Se încălzesc timp de 30 de minute deasupra unei băi de apă în fierbere, pentru a apărea culoarea. Se răcesc la temperatura camerei, se aduc la volum cu un amestec de propan-2-ol-hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea o oră (serii etalon).

Se determină, conform indicațiilor de la punctul 5.2, densitatea optică a soluțiilor din seriile etalon, prin comparație cu soluțiile corespunzătoare din seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin reprezentarea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile de gosipol (în  $\mu\text{g}$ ).

**6.2.2. Gosipolul total**

Se prepară șase baloane gradate de 50 ml. În primul balon se plasează 10 ml de solvent B (3.3), iar în celelalte 2, 4, 6, 8 și 10 ml de soluție etalon de gosipol B (3.6). Se completează conținutul fiecărui balon până la 10 ml cu solvent B (3.3). Se încălzesc timp de 30 de minute într-o baie de apă în fierbere. Se răcesc la temperatura camerei, se completează volumul cu un amestec de propan-2-ol-hexan (3.1) și se omogenizează.

Se plasează 2 ml din aceste soluții în fiecare din cele două serii de câte șase baloane gradate de 25 ml. Se completează conținutul baloanelor din prima serie până la 25 ml cu un amestec de propan-2-ol-hexan (3.1) (serii de referință).

Se adaugă 2 ml de anilină (3.4) la fiecare balon din a doua serie. Se încălzesc timp de 30 de minute într-o baie de apă în fierbere. Se răcesc la temperatura camerei, se aduc la volum cu un amestec de propan-2-ol-hexan (3.1), se omogenizează și se lasă să stea timp de o oră (serii etalon).

Se determină, conform indicațiilor de la punctul 5.2, densitatea optică a soluțiilor din seriile etalon, prin comparație cu soluțiile corespunzătoare din seriile de referință. Se trasează curba de calibrare prin reprezentarea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile de gosipol (în  $\mu\text{g}$ ).

**6.3. Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

- 15 %, în valoare relativă, pentru un conținut de gosipol mai mic de 500 ppm;
- 75 ppm, în valoare absolută, pentru un conținut de gosipol de minimum 500 ppm și maximum 750 ppm;
- 10 %, în valoare relativă la cea mai înaltă valoare, pentru un conținut de gosipol mai mare de 750 ppm.



## ▼ M6

## B. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI

## CAPITOLUL I

## Metode de eșantionare și de interpretare a rezultatelor analitice

## 1. Domeniu de aplicare și definiții

Probele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați de tipul dioxinelor (PCB)<sup>(1)</sup> și PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din furaje sunt prelevate în conformitate cu dispozițiile din anexa I. Se aplică cerințele cantitative privind controlul substanțelor sau produselor repartizate uniform în furaje, așa cum sunt prevăzute la punctul 5.1 din anexa I. Probele agregat astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în probele de laborator se stabilește dacă se respectă nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.

În sensul prezentei părți B, se aplică definițiile menționate în anexa I la Decizia 2002/657/CE a Comisiei<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> Tabelul factorilor de echivalență toxică (TEF – *toxic equivalency factors*), pentru PCDD, PCDF și PCB-uri de tipul dioxinelor: Factorii de echivalență toxică ai OMS (OMS-TEF) pentru evaluarea riscurilor pentru sănătatea umană se bazează pe concluziile reuniunii de experți din cadrul Programului internațional pentru securitate chimică (IPCS) al OMS, care a avut loc la Geneva în iunie 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)].

Congener	Valoare TEF	Congener	Valoare TEF
P-dibenzodioxine („PCDD-uri”) și p-dibenzofurani („PCDF-uri”)		PCB-uri de tipul dioxinelor PCB-uri non-orto + PCB-uri mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB-uri non-orto	
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	PCB-uri mono-orto	
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		

Abrevieri utilizate: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = hexa; „Hp” = hepta; „O” = octa; „CDD” = clorodibenzodioxină; „CDF” = clorodibenzofuran; „CB” = clorobifenil.

<sup>(2)</sup> Decizia 2002/657/CE a Comisiei din 14 august 2002 de stabilire a normelor de aplicare a Directivei 96/23/CE a Consiliului privind funcționarea metodelor de analiză și interpretarea rezultatelor (JO L 221, 17.8.2002, p. 8).

▼ **M6**

În plus față de aceste definiții, în sensul prezentei părți B se aplică următoarele definiții:

„Metode de screening” sunt metode utilizate pentru selectarea probelor cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Ele permit o capacitate sporită de analiză a probelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau metode GC-MS. Rezultatele de la probele care depășesc valoarea-limită utilizată pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală printr-o metodă de confirmare.

„Metode de confirmare” sunt metode care furnizează informații complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la pragul maxim sau, la nevoie, la pragul de acțiune. Aceste metode utilizează cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GC-HRMS) sau cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS).

## 2. Conformitatea lotului sau a sublotului cu nivelul maxim

### 2.1. În ceea ce privește PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor

Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul analitic al sumei PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180 (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor) nu depășește nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă<sup>(1)</sup>. Lotul sau sublotul nu respectă nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE în cazul în care media celor două rezultate analitice ale estimării superioare<sup>(2)</sup> obținută printr-o analiză duplicat<sup>(3)</sup>, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă, depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, adică, pentru a evalua conformitatea, se folosește concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă.

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot este considerat neconform dacă valorile măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei sunt mai mari decât nivelul maxim.

<sup>(1)</sup> Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în „Ghidul privind incertitudinea de măsurare pentru laboratoarele care efectuează analize de PCDD/F și PCB utilizând spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor” ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(2)</sup> Conceptul de „estimare superioară” necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „estimare inferioară” necesită utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „estimare mediană” necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare la calcularea contribuției fiecărui congener necuantificat.

<sup>(3)</sup> Analiza duplicat: analiza separată a analiților de interes, folosind o a doua parte alicotă din aceeași probă omogenizată. În general, se aplică cerințele pentru analiza duplicat, astfel cum sunt prevăzute în anexa II capitolul C punctul 3. Cu toate acestea, pentru metodele care utilizează etalonul intern marcat cu <sup>13</sup>C pentru analiții relevanți, analiza duplicat este necesară doar în cazul în care rezultatul primei determinări nu este conform. Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a incurcării accidentale a probelor. În cazul în care analiza este efectuată în contextul unui incident de contaminare, se poate omite confirmarea printr-o analiză duplicat atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate prin trasabilitate cu incidentul de contaminare și nivelul constat este cu mult peste nivelul maxim.

▼ **M6**

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

2.2. *Referitor la PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor*

Lotul sau subplotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul unei singure analize

- efectuate printr-o metodă de screening, cu o rată a rezultatelor fals conforme sub 5 %, indică faptul că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE;
- efectuate printr-o metodă de confirmare, nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă.

Pentru testele de screening, se stabilește o valoare-limită pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD-uri/PCDF-uri, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor.

Lotul sau subplotul este considerat neconform cu nivelul maxim conform Directivei 2002/32/CE dacă media celor două rezultate analitice ale estimării superioare <sup>(1)</sup> obținute în urma unei analize duplicat <sup>(2)</sup> depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă, adică pentru a evalua conformitatea, este utilizată concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă.

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un subplot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim.

Se utilizează suma incertitudinilor extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau de arbitraj, se aplică reglementările naționale.

<sup>(1)</sup> Conceptul de „estimare superioară” necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ). Conceptul de „estimare inferioară” necesită utilizarea valorii zero pentru contribuția fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ). Conceptul de „estimare mediană” necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare la calcularea contribuției fiecărui congener necuantificat la echivalentul toxic (TEQ).

<sup>(2)</sup> În general, se aplică cerințele pentru analiza duplicat, astfel cum sunt prevăzute în anexa II capitolul C punctul 2. Cu toate acestea, pentru metodele de confirmare care utilizează etalonul intern marcat cu <sup>13</sup>C pentru analiții relevanți, analiza duplicat este necesară doar în cazul în care rezultatul primei determinări nu este conform. Analiza duplicat este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încruciate interne sau a încercării accidentale a probelor. În cazul în care analiza este efectuată în contextul unui incident de contaminare, se poate omite confirmarea printr-o analiză duplicat atunci când probele selecționate pentru analiză sunt asociate prin trasabilitate cu incidentul de contaminare și nivelul constat este cu mult peste nivelul maxim.

▼ **M6****3. Rezultate care depășesc pragurile de acțiune stabilite în anexa II la Directiva 2002/32/CE**

Pragurile de acțiune servesc ca instrument pentru selectarea probelor în cazurile în care este necesar să se identifice o sursă de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor probe. În cazul în care sunt necesare eforturi importante pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea, s-ar putea să fie adecvat să se confirme depășirea pragurilor de acțiune printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă<sup>(1)</sup>.

*CAPITOLUL II****Pregătirea probelor și cerințe privind metodele de analiză utilizate pentru controlul oficial al nivelurilor de dioxine (PCDD/PCDF) și de PCB-uri de tipul dioxinelor din furaje*****1. Domeniul de aplicare**

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCDD/PCDF substituie la pozițiile 2,3,7,8 și PCB-uri de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005 al Parlamentului European și al Consiliului<sup>(2)</sup>.

Monitorizarea prezenței PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în furaje poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode analitice:

**(a) Metode de screening**

Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor probe cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Metodele de screening trebuie să garanteze o capacitate sporită de analiză a probelor, eficiență din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Aplicarea lor trebuie să urmărească evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS.

Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare-limită, determinând o decizie de tip da/nu în legătură cu eventuala depășire a nivelului maxim sau a pragului de acțiune. Concentrația PCDD-urilor/PCDF-urilor și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probele suspectate a fi neconforme cu nivelul maxim trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare.

În plus, metodele de screening pot oferi o indicație a nivelului de PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prezente în probă. În cazul aplicării metodelor bioanalitice de screening, rezultatul se exprimă ca echivalente bioanalitice (BEQ), iar în cazul aplicării metodelor GC-MS fizico-chimice se exprimă ca echivalente toxice (TEQ). Rezultatele exprimate numeric ale metodelor de screening

<sup>(1)</sup> Explicație și cerințe identice pentru analiza duplicat pentru controlul pragurilor de acțiune ca în nota de subsol 2 de mai sus pentru nivelurile maxime.

<sup>(2)</sup> Regulamentul (CE) nr. 183/2005 al Parlamentului European și al Consiliului din 12 ianuarie 2005 de stabilire a cerințelor privind igiena furajelor (JO L 35, 8.2.2005, p. 1).

**▼M6**

sunt utile pentru a dovedi conformitatea sau suspiciunea de neconformitate sau depășirea pragurilor de acțiune și oferă o indicație a intervalului în care se situează nivelurile în vederea monitorizării prin metode de confirmare. Acestea nu sunt adecvate pentru scopuri precum evaluarea nivelurilor de fond, aprecierea prelevării, urmărirea tendințelor pe care le urmează nivelurile în timp sau reevaluarea pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime.

**(b) Metode de confirmare**

Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații depline la nivel de congener. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a pragurilor de acțiune, inclusiv confirmarea rezultatelor obținute prin metodele de screening. În plus, rezultatele pot fi folosite și pentru alte scopuri, precum determinarea nivelurilor de fond scăzute în monitorizarea furajelor, urmărirea tendințelor în timp, evaluarea expunerii și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru a confirma respectarea sau nerespectarea nivelului maxim, se poate utiliza, de asemenea, GC-MS/MS.

**2. Context**

Pentru calcularea concentrațiilor echivalentelor toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător (a se vedea nota de subsol 1 de la capitolul I) și apoi se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri.

În sensul prezentei părți B, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener individual înseamnă conținutul minim al unui analit care poate fi măsurat cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute la nivel internațional, de exemplu, EN 16215:2012 (Nutrețuri – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.

Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi identificată drept:

- (a) concentrația unui analit din extractul unei probe care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie monitorizată printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul de date primare cel mai puțin intens; sau
- (b) în cazul în care, din motive tehnice, calculul raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile, punctul cel mai mic de concentrație de pe o curbă de etalonare care oferă o deviație acceptabilă ( $\leq 30\%$ ) și coerentă (măsurată cel puțin la începutul și la sfârșitul unei serii analitice de probe) de la factorul de răspuns relativ mediu calculat pentru toate punctele de pe curba de etalonare pentru fiecare serie de probe. Limita de cuantificare (LOQ) se calculează de la cel mai mic punct de concentrație ținând seama de recuperarea etaloanelor interne și de prelevarea de probe.

**▼M6**

Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație<sup>(1)</sup> a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ) pentru a ține cont de faptul că nu toți compușii prezenți într-un extract de probă care produce un răspuns în cadrul testului pot să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ.

Metodele de screening și de confirmare pot fi aplicate pentru controlul unei anumite matrice numai dacă metodele sunt suficient de sensibile pentru a detecta în mod fiabil niveluri la pragul de acțiune sau nivelul maxim.

**3. Cerințe de asigurare a calității**

- 3.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză.
- 3.2. Probele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe.
- 3.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj.
- 3.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu care s-a dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm). Probele se usucă înainte de mărunțire, dacă conținutul de umiditate este prea mare.
- 3.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ.
- 3.6. Se realizează o analiză-martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.
- 3.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se verifica dacă sunt liberi de compuși care perturbă detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD-uri/PCDF-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia.
- 3.8. Cantitatea de probă utilizată pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile nivelurilor maxime sau pragul de acțiune.
- 3.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional.

<sup>(1)</sup> Metodele bioanalitice nu sunt specifice pentru acei congeneri incluși în schema TEF. În extractul de probă pot fi prezenți alți compuși AhR-activi înrudiți structural care contribuie la răspunsul global. Prin urmare, rezultatele bioanalitice nu pot fi o estimare, ci mai degrabă un indiciu al nivelului TEQ din probă.

▼ **M6****4. Cerințe pentru laboratoare**

4.1. În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (CE) nr. 882/2004, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. Dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCDD/F-urilor și a PCB-urilor <sup>(1)</sup>.

4.2. Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de furaje și în intervalele de concentrații relevante.

4.3. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare, atât pentru controlul calității, cât și pentru confirmarea rezultatului analitic al probelor suspectate.

**5. Cerințe de bază privind procedura analitică pentru dioxine (PCDD/F-uri) și PCB-uri de tipul dioxinelor****5.1. Intervalul de lucru la niveluri mici și limitele de cuantificare**

Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt de ordinul femtoqramelor ( $10^{-15}$  g), extremitatea superioară a intervalului, din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor ( $10^{-9}$  g) este deja suficientă. Pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor substituiți non-orto), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor ( $10^{-12}$  g). Pentru toți ceilalți congeneri PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor ( $10^{-9}$  g) este suficientă.

**5.2. Selectivitate (specificitate) mare**

5.2.1. Este necesar să se facă o distincție între PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași și care pot să interfereze, prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele GC-MS, este necesar să se facă deosebirea între diferiți congeneri, cum ar fi între cei toxici (de exemplu, cele 17 PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și cele 12 PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri.

5.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate fals neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate fals conforme.

**5.3. Acuratețe ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului)**

5.3.1. Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea ridicată este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unei probe din cauza fiabilității reduse a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin *autenticitate* (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit

<sup>(1)</sup> „Ghidul privind incertitudinea de măsurare pentru laboratoarele care efectuează analize de PCDD/F și PCB utilizând spectrometria de masă prin metoda de diluție a izotopilor” ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)), „Ghidul privind estimarea LDD și LDC pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

▼ **M6**

pe un material certificat și valoarea sa certificată, exprimată ca procent din această valoare) și *precizie* (deviația standard relativă  $RSD_R$  calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate).

5.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de etalonare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de determinarea-martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin metoda de confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și antagoniste), calitatea de ajustare a curbei sau diferențele dintre valorile factorilor de echivalență toxică (TEF) și ale potenței relative (REP). Recuperarea aparentă a biotestului se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului de interes.

5.4. *Validarea în intervalul nivelului maxim și măsuri generale de control al calității*

5.4.1. Laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului maxim, de exemplu,  $0,5 \times$ ,  $1 \times$  și  $2 \times$  nivelul maxim, cu un coeficient de variație acceptabil pentru analize repetate, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină.

5.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale martorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică graficele de control al calității pentru controalele martorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.

5.5. *Limita de cuantificare*

5.5.1. Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea limitei de cuantificare (LOQ) nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să dovedească că se poate face distincție între valoarea-martor și valoarea-limită. La furnizarea unui nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Nivelul de raportare se dovedește a fi diferit de probele-martor din cadrul procedurii cel puțin cu un factor de trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test-martor.

5.5.2. Limita de cuantificare (LOQ) pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. *Criterii analitice*

Pentru rezultate fiabile în urma metodelor de confirmare sau de screening, trebuie să fie respectate următoarele criterii în intervalul nivelului maxim pentru valoarea TEQ sau, respectiv, BEQ, indiferent dacă este determinată ca TEQ total sau BEQ total (ca sumă de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor) sau separat pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor:



▼ **M6**

	Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare
Rată fals conforme <sup>(1)</sup>	< 5 %	
Autenticitate		- 20 % până la + 20 %
Repetabilitate (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Precizie intermediară (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

<sup>(1)</sup> În raport cu nivelurile maxime.

5.7. *Cerințe specifice pentru metodele de screening*

5.7.1. Pot fi folosite pentru screening atât metodele GC-MS, cât și metodele bioanalitice. Pentru metodele GC-MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7.

5.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare.

5.7.3. Performanța metodei de screening trebuie verificată în timpul analizei de rutină, printr-un control al calității analizelor și printr-o validare continuă a metodei. Trebuie să existe un program continuu pentru controlul rezultatelor conforme.

5.7.4. Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității:

20 % din extractele de probe sunt măsurate în screeningul de rutină cu și fără 2,3,7,8-TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de pragul de acțiune, pentru a verifica dacă răspunsul este, eventual, suprimat de către substanțele interferente prezente în extractul de probă. Concentrația măsurată a probei îmbogățite se compară cu suma concentrației extractului neîmbogățit, plus concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este cu peste 25 % mai mică decât concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă este supusă analizei de confirmare prin GC-HRMS. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității.

5.7.5. Controlul calității probelor conforme:

Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, sunt confirmate prin GC-HRMS.

5.7.6. Determinarea ratelor rezultatelor fals conforme pornind de la datele de control al calității:

Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele rezultatelor fals conforme reale trebuie să fie sub 5 %. Atunci când, în urma controlului de calitate al probelor conforme, sunt disponibile cel puțin 20 de rezultate confirmate per matrice/grup de matrice, concluziile privind

▼ **M6**

rata rezultatelor fals conforme trebuie să fie desprinse din această bază de date. Rezultatele probelor analizate prin intermediul testărilor interlaboratoare sau în timpul incidentelor de contaminare, care acoperă un interval de concentrații de până la, de exemplu,  $2 \times$  nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei rezultatelor fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.

Deși testele de screening au, preferabil, ca scop detectarea probelor care depășesc pragul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor rezultatelor fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare.

- 5.7.7. Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului se verifică întotdeauna printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă analitică de confirmare. Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor fals neconforme. Pentru metodele de screening, rata rezultatelor fals neconforme este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat în legătură cu proba că este potențial neconformă. Evaluarea avantajelor metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă.
- 5.7.8. În condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ.

Și pentru metodele bioanalitice efectuate în condiții de repetabilitate, valoarea  $RSD_r$  intralaborator ar fi, în general, mai mică decât în condiții de reproductibilitate ( $RSD_R$ ).

**6. Cerințe specifice privind metodele GC-MS care trebuie respectate în scop de screening sau de confirmare**

**6.1. Diferențe acceptabile între estimarea superioară și estimarea inferioară a rezultatelor OMS-TEQ**

Diferența dintre nivelul estimării superioare și cel al estimării inferioare nu depășește 20 % pentru confirmarea depășirii nivelului maxim sau în cazul în care sunt necesare praguri de acțiune.

**6.2. Controlul recuperărilor**

- 6.2.1. La începutul metodei de analiză, de exemplu, înaintea fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu  $^{13}\text{C}$  și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu  $^{13}\text{C}$ , pentru a se valida procedura analitică. Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra- până la octo-clorurate de PCDD/F-uri și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB-uri de tipul dioxinelor (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă utilizat pentru monitorizarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, trebuie utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8, marcate cu  $^{13}\text{C}$  și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu  $^{13}\text{C}$ .

▼ **M6**

- 6.2.2. De asemenea, se determină factorii de răspuns relativ pentru acei congeneri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu  $^{13}\text{C}$ , utilizându-se soluții de etalonare corespunzătoare.
- 6.2.3. Pentru furajele de origine vegetală și furajele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru furajele de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înaintea extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne.
- 6.2.4. Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).
- 6.2.5. Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele p-dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening prin GC-MS, recuperările trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.
- 6.3. *Eliminarea substanțelor interferente*
- Separarea PCDD/PCDF-urilor de compuși clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și bifenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumină și/sau cărbune).
  - Separarea izomerilor prin cromatografie în fază gazoasă este < 25 % de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 6.4. *Etalonarea cu curba standard*
- Intervalul curbei de etalonare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau praguri de acțiune.
- 6.5. *Criterii specifice pentru metodele de confirmare*
- Pentru GC-HRMS:
 

În HRMS, rezoluția caracteristică trebuie să fie mai mare sau egală cu 10 000 pentru întregul interval al maselor, cu o concavitate de 10 %.

Îndeplinirea criteriilor de identificare și confirmare suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Nutrețuri – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite.
  - Pentru GC-MS/MS:
 

Monitorizarea a cel puțin doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs, pentru toți analiții etichetați și neetichetați din domeniul de aplicare al analizei.

Toleranța maximă admisă a intensităților relative ale ionilor de  $\pm 15\%$  pentru ionii de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (medie din standardele de etalonare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia de coliziune și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit.

▼ **M6**

Rezoluția fiecărui cuadropol trebuie să fie stabilită ca fiind egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: rezoluție suficientă pentru a separa două vârfuri ale unei unități de masă) în scopul de a reduce la minimum interferențele posibile cu analiții de interes.

Îndeplinirea criteriilor suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Nutrețuri – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite, cu excepția obligației de a utiliza GC-HRMS.

## 7. Cerințe specifice pentru metodele bioanalitice

Metodele bioanalitice sunt metode bazate pe utilizarea de principii biologice precum testele pe bază de celule sau de receptori sau imuno-dozări. Prezentul punct 7 stabilește cerințe pentru metodele bioanalitice în general.

O metodă de screening, în principiu, clasifică o probă ca fiind conformă sau suspectată a fi neconformă. În acest scop, nivelul BEQ calculat este comparat cu valoarea-limită (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând o analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ echivalent cu 2/3 din nivelul maxim poate servi drept valoare-limită, cu condiția să se asigure o rată a rezultatelor fals conforme de sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori-limită corespunzătoare ale biotestelor pentru PCDD-uri/PCDF-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al pragului de acțiune respectiv este considerat adecvat ca valoare-limită.

Dacă un nivel indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele probelor trebuie să fie în intervalul de lucru și să depășească limita de raportare (a se vedea punctele 7.1.1 și 7.1.6).

### 7.1. Evaluarea răspunsului la test

#### 7.1.1. Condiții generale

— Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de etalonare a TCDD, valorile la extremitățile superioare ale curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care acest CV este mai mic de 15 %. Extremitatea inferioară a intervalului de lucru (limita de raportare) se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii. Extremitatea superioară a intervalului de lucru este, de obicei, reprezentată de valoarea EC<sub>70</sub> (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru se stabilește în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 7.3) se situează în intervalul de lucru.

— Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate în triplicat sau cel puțin în duplicat. Atunci când se utilizează duplicate, o soluție etalon sau un extract de control testată (testat) în patru până la șase godeuri repartizate pe placă trebuie să producă un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %.

**▼M6**

## 7.1.2. Etalonarea

## 7.1.2.1. Etalonarea cu curba standard

- Nivelurile din probe se estimează prin compararea răspunsului la test cu o curbă de etalonare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/PCDF/PCB de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă.
  
- Curbele de etalonare conțin între opt și 12 concentrații (cel puțin în duplicate), cu concentrații suficiente în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Ca atare, valoarea  $R^2$  are valoare redusă sau nicio valoare în estimarea calității ajustării în regresia neliniară. Se ajunge la o ajustare mai bună prin reducerea la minimum a diferenței între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minimum a sumei pătratelor rezidualelor.
  
- Nivelul estimat din extractul de probă este corectat ulterior pentru nivelul BEQ calculat pentru o probă-martor de matrice/solvent (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al probelor de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 7.2.

## 7.1.2.2. Etalonarea cu probe de referință

Alternativ, poate fi utilizată o curbă de etalonare realizată pe baza a cel puțin patru probe de referință (a se vedea punctul 7.2.4): poate fi utilizată o probă-martor de matrice, plus trei probe de referință de  $0,5 \times$ ,  $1,0 \times$  și  $2,0 \times$  nivelul maxim sau pragul de acțiune, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și de recuperare. În acest caz, răspunsul la test echivalent cu  $2/3$  din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare-limită. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor praguri de acțiune este considerat adecvat ca valoare-limită.

## 7.1.3. Determinarea separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor

Extractele pot fi divizate în fracțiuni care conțin PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, permițând o indicare separată a nivelurilor TEQ pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de etalonare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor.

## 7.1.4. Recuperări aparente ale biotestului

„Recuperarea aparentă a biotestului” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF<sup>(1)</sup> utilizați, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente reduse pentru PCB-urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD-uri/PCDF-uri. Prin urmare, în cazul în care se efectuează o determinare separată a

<sup>(1)</sup> Cerințele actuale se bazează pe TEF publicați în: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006).

▼ **M6**

PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale testului biologic sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 20 % și 60 %, pentru PCDD-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de etalonare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste intervale și se situează între 30 % și 130 %. Orice implicare a valorilor TEF revizuite în mod substanțial pentru legislația Uniunii pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor necesită revizuirea acestor intervale.

#### 7.1.5. Controlul recuperărilor pentru curățare

Pierderea de compuși în timpul curățării se verifică în timpul validării. O probă-martor îmbogățită cu un amestec de congeneri diferiți face obiectul curățării ( $n = 3$  cel puțin), iar recuperarea și variabilitatea sunt verificate printr-o metodă de confirmare. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congeneri care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri.

#### 7.1.6. Limita de raportare

Atunci când se raportează nivelurile BEQ, se determină o limită de raportare pornind de la probele de matrice relevante care implică modele tipice pentru congeneri, dar nu pornind de la curba de etalonare a standardelor, din cauza preciziei reduse în intervalul inferior al curbei. Se iau în considerare efectele extracției și ale curățării. Limita de raportare se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii.

#### 7.2. Utilizarea probelor de referință

7.2.1. Probele de referință reprezintă matricea probei, modelele pentru congeneri și intervalele de concentrație pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune.

7.2.2. În fiecare serie de teste, se includ o matrice-martor și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, o probă-martor din cadrul procedurii, precum și o probă de referință la nivelul maxim sau la pragul de acțiune. Aceste probe se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Proba de referință prezintă un răspuns cu mult mai mare în comparație cu proba-martor, asigurând astfel conformitatea testului. Aceste probe pot fi utilizate pentru corecțiile în funcție de martor și recuperare.

7.2.3. Probele de referință alese pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare sunt reprezentative pentru probele de testare, în sensul că modelele pentru congeneri nu pot conduce la o subestimare a nivelurilor.

7.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de  $0,5 \times$  și  $2 \times$  nivelul maxim sau pragul de acțiune, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 7.1.2.2).

▼ **M6**7.3. *Determinarea valorilor-limită*

Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele în urma metodei de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de etalonare în raport cu matricea, care implică probe de referință îmbogățite la 0, 0,5×, 1× și 2× față de nivelul maxim (NM), cu șase repetări la fiecare nivel (n = 24)]. Factorii de corecție (martor și recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, însă se verifică în conformitate cu punctul 7.2.2.

Valorile-limită se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul pragurilor de acțiune, în cazul în care acest lucru este relevant, cu nivelurile maxime sau pragul de acțiune respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Acestea sunt reprezentate prin extremitatea *inferioară* a distribuției rezultatelor bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) care corespund limitei de decizie a metodei de confirmare bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată a rezultatelor fals conforme < 5 %, și pe o valoare a  $RSD_R < 25 \%$ . Limita de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 7.3.1, 7.3.2 și 7.3.3 (a se vedea figura 1).

7.3.1. Utilizarea sectorului *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare

$$\text{Valoare - limită} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

unde:

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  BEQ corespunzând limitei de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă;

$s_{y,x}$  deviație standard reziduală;

$t_{\alpha,f=m-2}$  factor student ( $\alpha = 5 \%$ ,  $f =$  grade de libertate, asimetric);

$m$  numărul total de puncte de etalonare (indice  $j$ );

$n$  numărul de repetări la fiecare nivel;

$x_i$  concentrația probei (în TEQ) a punctului de etalonare  $i$  determinat printr-o metodă de confirmare;

$\bar{x}$  medie a concentrațiilor (în TEQ) ale tuturor probelor de etalonare;

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \text{ parametrul sumei pătratelor, } i = \text{indice pentru punctul de etalonare } i$$

7.3.2. Calcul pornind de la rezultatele bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) ale analizelor multiple ale probelor ( $n > 6$ ) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

$$\text{Valoarea-limită} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

unde:

$\text{SD}_R$  deviația standard a rezultatelor biotestului la  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

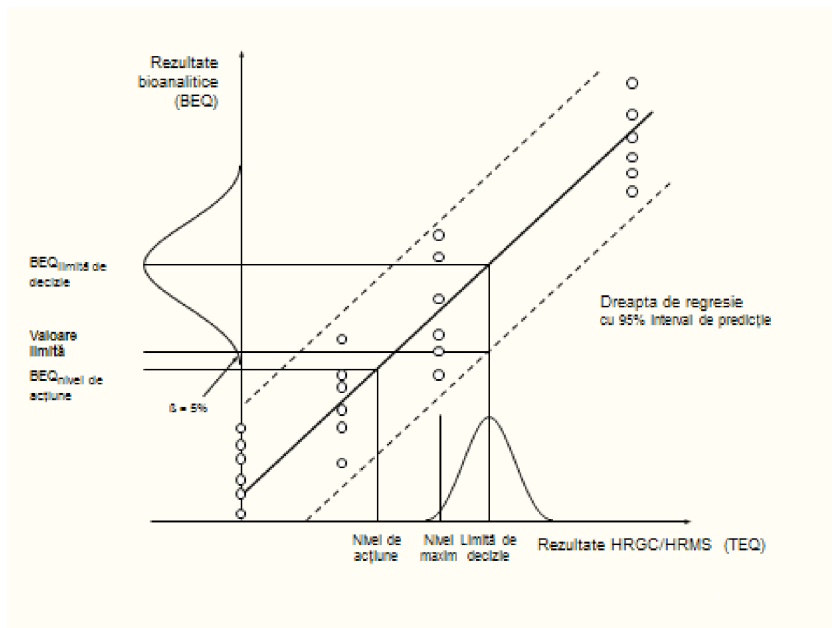
▼ **M6**

- 7.3.3. Calcul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectată în funcție de mator și recuperare) pornind de la analiza multiplă a probelor ( $n > 6$ ) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinate la punctul 7.3.1 sau la punctul 7.3.2:

Calcul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme  $< 5 \%$ , și pe o valoare a  $RSD_R < 25 \%$ :

1. pornind de la spectrul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie a metodei de confirmare;
2. pornind de la analiza multiplă a probelor ( $n > 6$ ) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor (reprezentată în figură printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

Figura 1



- 7.3.4. Restricții ale valorilor-limită

Valorile-limită bazate pe BEQ, calculate pornind de la valoarea  $RSD_R$  obținută în cursul validării utilizând un număr limitat de probe cu modele pentru matrice/congeneri diferite pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau pragurile de acțiune bazate pe TEQ datorită unei precizii mai mari decât cea realizabilă în analizele de rutină atunci când trebuie controlat un spectru necunoscut de posibile modele pentru congeneri. În astfel de cazuri, valorile-limită se calculează pornind de la  $RSD_R = 25 \%$  sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune.

7.4. *Caracteristici de performanță*

- 7.4.1. Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, testele cu privire la repetabilitatea metodelor bioanalitice se efectuează pentru obținerea unor informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste și între serii de teste. Repetabilitatea trebuie să fie sub 20 %, iar reproductibilitatea intralaborator sub 25 %. Aceasta se bazează pe nivelurile calculate în BEQ după corecția în funcție de mator și recuperare.



**▼ M6**

- 7.4.2. Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită stabilirea diferenței între o probă-martor și un nivel la valoarea-limită, permițând identificarea probelor peste valoarea-limită corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2).
- 7.4.3. Se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale matorului.
- 7.4.4. Deviația standard procentuală a răspunsului sau a concentrației calculate pornind de la răspuns (posibilă numai în intervalul de lucru) a unei determinări triple a unui extract de probă nu poate fi mai mare de 15 %.
- 7.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimată (exprimate) în BEQ (martor și nivelul maxim sau pragul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.
- 7.4.6. Graficele de control al calității pentru martorii procedurii și fiecare tip de probă de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că performanța analitică este în conformitate cu cerințele, în special pentru martorii procedurii cu privire la diferența minimă solicitată la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Martorii procedurii sunt controlați într-un mod care să evite rezultatele fals conforme atunci când se scad.
- 7.4.7. Rezultatele metodelor de confirmare ale probelor suspectate și a 2-10 % din probele conforme (minimum 20 de probe pentru fiecare matrice) sunt colectate și folosite pentru a evalua performanța metodei de screening și relația între BEQ și TEQ. Această bază de date poate fi utilizată pentru reevaluarea valorilor-limită aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate.
- 7.4.8. Buna performanță a metodelor poate fi, de asemenea, demonstrată prin participarea la testările interlaboratoare. Rezultatele probelor analizate în testările interlaboratoare, care acoperă un interval de concentrații care să ajungă până la, de exemplu,  $2 \times$  nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei rezultatelor fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.
- 7.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident.

**8. Raportarea rezultatelor****8.1. Metode de confirmare**

- 8.1.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și sunt raportate ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințe specifice.
- 8.1.2. Raportul trebuie să includă metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

▼ **M6**

- 8.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 8.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca  $x \pm U$ , unde  $x$  este rezultatul analitic și  $U$  este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, se utilizează suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 8.1.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.
- 8.2. *Metode bioanalitice de screening*
- 8.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).
- 8.2.2. În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu în TEQ.
- 8.2.3. Probele cu un răspuns inferior limitei de raportare se exprimă ca fiind „sub limita de raportare”. Rezultatul probelor cu un răspuns peste intervalul de lucru se raportează ca „depășind intervalul de lucru”, iar nivelul corespunzător extremității superioare a intervalului de lucru se furnizează în BEQ.
- 8.2.4. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.
- 8.2.5. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de etalonare.
- 8.2.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 8.2.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.
- 8.2.8. Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare.
- 8.3. *Metode fizico-chimice de screening*
- 8.3.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).
- 8.3.2. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

**▼M6**

- 8.3.3. În plus, nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și/sau ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ se pot furniza ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.
- 8.3.5. Raportul trebuie să menționeze metoda GC-MS utilizată.
- 8.3.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.
- 8.3.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.
- 8.3.8. Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare.

*CAPITOLUL III**Pregătirea probelor și cerințe privind metodele de analiză utilizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din furaje***1. Domeniul de aplicare**

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de bifenili policlorurați care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor), precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005.

**2. Metode de detectare aplicabile**

Gaz-cromatografie/detectare prin captură de electroni (GC-CDE), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS sau metode echivalente.

**3. Identificarea și confirmarea analiților de interes**

- 3.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă  $\pm 0,25\%$ ).
- 3.2. Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri co-eluate, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să se confirme<sup>(1)</sup>.
- 3.3. Cerințe pentru tehnici GC-MS

Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:

- (a) doi ioni specifici pentru HRMS;

<sup>(1)</sup> Congeneri despre care s-a constatat că sunt adesea co-eluanți sunt, de exemplu, PCB 28/31, PCB 52/69 și PCB 138/163/164. Pentru GC-MS, este necesar să se țină seama și de interferențele posibile din partea fragmentelor de congeneri mai puternic clorurați.

**▼ M6**

- (b) trei ioni specifici pentru LRMS;
- (c) doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs pentru MS-MS.

Toleranțele maxime admisibile pentru raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate:

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a abundenței izotopice sau standardul de etalonare pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) calificativ(i):  $\pm 15 \%$

#### 3.4. Cerințe pentru tehnici de GC-DCE

Rezultatele care depășesc nivelul maxim sunt confirmate cu două coloane de GC cu faze staționare de polaritate diferită.

#### 4. Demonstrarea randamentului metodei

Randamentul metodei se validează în intervalul nivelului maxim (0,5 la  $2 \times$  nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 9).

#### 5. Limita de cuantificare

Suma limitelor de cuantificare (LOQ) <sup>(1)</sup> ale PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim <sup>(2)</sup>.

#### 6. Controlul calității

Controale ale martorului, analiză a probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante, la intervale regulate.

#### 7. Controlul recuperărilor

7.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.

7.2. Adăugarea de etaloane interne:

adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare).

7.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop:

- (a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne;
- (b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;
- (c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10 % sunt acceptabile.

7.4. Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:

- (a) recuperarea etalonului (etalloanelor) intern(e) se controlează pentru fiecare probă;

<sup>(1)</sup> Dacă este cazul, se aplică principiile descrise în „Ghidul privind estimarea LOD și LOQ pentru măsurătorile în domeniul contaminanților din produsele alimentare și din hrana pentru animale” ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(2)</sup> Este foarte recomandabil să existe o contribuție mai scăzută a nivelului reactivului-martor la nivelul unui contaminant dintr-o probă. Este responsabilitatea laboratorului să controleze variația nivelurilor reacțiilor-martor, în special în cazul în care nivelurile reacțiilor-martor se scad.

▼ **M6**

(b) recuperările etalonului (etalonelor) intern(e) sunt între 60 % și 120 %;

(c) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne.

7.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 60 și 120 %.

#### 8. Cerințe pentru laboratoare

În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (CE) nr. 882/2004, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. În plus, dacă este cazul, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCB-urilor <sup>(1)</sup>.

#### 9. Caracteristici de performanță: criteriile pentru suma celor șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor la nivelul maxim

	Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor <sup>(1)</sup>	Alte tehnici
Autenticitate	- 20 până la + 20 %	- 30 până la + 30 %
Precizie intermediară (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %

<sup>(1)</sup> Utilizarea tuturor celor șase analogi marcați <sup>13</sup>C, conform standardelor interne.

#### 10. Raportarea rezultatelor

10.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor individuali care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor congeneri raportați ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.

10.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor.

10.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.

10.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus și el la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca  $x \pm U$ , unde  $x$  este rezultatul analitic și  $U$  este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.

10.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE.

<sup>(1)</sup> Cerințele actuale se bazează pe TEF publicați în: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006).

▼ **M2**

## ANEXA VI

**METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA  
CONSTITUENȚILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL  
OFICIAL AL FURAJELOR**

## 1. SCOPUL ȘI DOMENIUL DE APLICARE

Determinarea constituenților de origine animală în furaje se efectuează prin microscopie optică sau reacție în lanț a polimerazei (PCR), în conformitate cu dispozițiile stabilite în prezenta anexă.

Aceste două metode fac posibilă detectarea prezenței constituenților de origine animală în materiile prime furajere și furajele combinate. Totuși, ele nu fac posibilă calcularea cantității acestor constituenți în materiile prime furajere și furajele combinate. Ambele metode au o limită de detecție sub 0,1 % (g/g).

Metoda PCR face posibilă identificarea grupului taxonomic al constituenților de origine animală prezenți în materiile prime furajere și furajele combinate.

Aceste metode se aplică pentru controlul aplicării interdicțiilor prevăzute la articolul 7 alineatul (1) și anexa IV la Regulamentul (CE) nr. 999/2001 și la articolul 11 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 1069/2009.

În funcție de tipul de furaj în curs de testare, aceste metode pot fi utilizate, în cadrul unui singur protocol operațional, fie singure, fie combinate împreună în conformitate cu procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia<sup>(1)</sup>.

## 2. METODE

## 2.1. Microscopie optică

2.1.1. ► **M7** *Principiu*

Constituenții de origine animală care pot fi prezenți în materiile prime furajere și furajele combinate trimise pentru a fi analizate se identifică pe baza caracteristicilor tipice, identificabile prin examinare microscopică, cum ar fi fibre musculare și alte particule de carne, cartilajii, oase, coarne, păr, păr de porc, sânge, globule grase din lapte, cristale de lactoză, pene, coji de ouă, oase și solzi de pește. ◀

2.1.2. *Reactivi și echipamente*

## 2.1.2.1. Reactivi

## 2.1.2.1.1. Agent de concentrare

## 2.1.2.1.1.1. Tetracloretilenă (greutate specifică 1,62)

## 2.1.2.1.2. Agent de colorare

## 2.1.2.1.2.1. Soluție de roșu de alizarină (se diluează 2,5 ml acid clorhidric 1M în 100 ml apă și se adaugă 200 mg roșu de alizarină în soluția obținută)

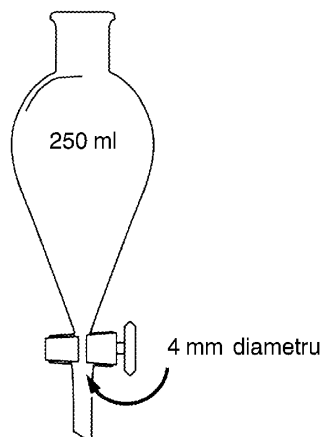
## 2.1.2.1.3. Mediu de montare

## 2.1.2.1.3.1. Leșie (NaOH 2,5 % g/v sau KOH 2,5 % g/v)

<sup>(1)</sup> <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2. ► **M7** Glicerol (nediluat, vâscozitate: 1 490 cP) sau un mediu de montare cu proprietăți echivalente pentru pregătirea lamelor nepermanente ◀
- 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (vâscozitate: 1 200 cP) sau o rășină cu proprietăți echivalente pentru pregătirea lamelor permanente
- 2.1.2.1.4. Mediu de montare cu proprietăți de colorare
- 2.1.2.1.4.1. Soluție Lugol (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent)
- 2.1.2.1.4.2. Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml apă)
- 2.1.2.1.4.3. Reactiv Fehling [preparat înainte de utilizare din părți egale (1/1) a două soluții stoc A și B. Soluția A: se dizolvă 6,9 g sulfat de cupru (II) pentahidrat în 100 ml apă. Soluția B: se dizolvă 34,6 g tartrat de sodiu și potasiu tetrahidrat și 12 g NaOH în 100 ml apă]
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidină/Peroxid de hidrogen [se dizolvă 1 g de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidină (TMB) în 100 ml de acid acetic glacial și 150 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă patru părți din această soluție TMB cu o parte de peroxid de hidrogen 3 %]
- 2.1.2.1.5. Agenți de limpezire
- 2.1.2.1.5.1. Etanol  $\geq 96$  % (puritate tehnică)
- 2.1.2.1.5.2. Acetonă (puritate tehnică)
- 2.1.2.1.6. Agent de decolorare
- 2.1.2.1.6.1. Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9-14 % clor activ)
- 2.1.2.2. Echipamente
- 2.1.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g
- 2.1.2.2.2. ► **M7** Echipament de măcinare: moară cu cuțite sau moară cu rotor. Dacă este utilizată o moară cu rotor, sitele  $\leq 0,5$  mm sunt interzise ◀
- 2.1.2.2.3. ► **M7** Sitele cu ochiuri pătrate de 0,25 mm și 1 mm lățime. Cu excepția cernerii în prealabil a eșantioanelor, diametrul sitelor nu trebuie să depășească 10 cm pentru a evita pierderea de materiale. Nu este necesară calibrarea sitelor ◀
- 2.1.2.2.4. Pâlnie de separare conică din sticlă cu un conținut de 250 ml cu robinet din teflon sau din sticlă șlefuită la baza conului. Diametrul de deschidere al robinetului trebuie să fie  $\geq 4$  mm. De asemenea, se poate folosi un pahar de sedimentare cu fund conic, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat că nivelurile de detecție sunt echivalente cu cele obținute utilizând pâlnia de separare conică din sticlă.

**Pâlnie de separare**

▼ **M2**

- 2.1.2.2.5. Microscop stereoscopic care să acopere cel puțin o gamă de amplificare finală de la 6,5 la 40 de ori
- 2.1.2.2.6. Microscop compus care acoperă cel puțin o gamă de amplificare finală de la 100 la 400 de ori, în câmp luminos cu lumină transmisă. Se pot utiliza, în plus, lumina polarizată și contrastul interferențial diferențial
- 2.1.2.2.7. Sticlărie de laborator standard
- 2.1.2.2.8. Echipamente pentru pregătirea lamelor: lame de microscop clasice, lame tubulare, lame de acoperire (20 × 20 mm), pensete, spatulă fină

▼ **M7**

- 2.1.2.2.9. Cuptor de laborator
- 2.1.2.2.10. Centrifugă
- 2.1.2.2.11. Filtru de hârtie: filtru din celuloză de calitate (dimensiunea porilor 4-11 μm)

▼ **M2**2.1.3. *Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor*2.1.3.1. ► **M7** Eșantionare

Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile din anexa I la prezentul regulament. ◀

## 2.1.3.2. Precauțiile ce trebuie luate

Pentru a se evita contaminarea încrucișată în laborator, toate echipamentele reutilizabile sunt curățate cu grijă înainte de utilizare. Piesele pâlniei de separare sunt demontate înainte de curățare. Piesele pâlniei de separare și sticlăria sunt prespălate manual și apoi spălate în mașina de spălat. Sitele sunt curățate utilizând o perie cu peri sintetici aspri. Se recomandă curățarea finală a sitelor cu acetonă și aer comprimat după cernerea materiilor grase, precum făina de pește.

## 2.1.3.3. Pregătirea eșantioanelor, altele decât grăsimi sau uleiuri

2.1.3.3.1. ► **M7** Uscarea eșantioanelor: eșantioanele cu un conținut de umiditate > 14 % se usucă înainte de tratare în conformitate cu anexa III la prezentul regulament. ◀2.1.3.3.2. ► **M7** Cernerea în prealabil a eșantioanelor: pentru a colecta informații privind posibila contaminare ambientală a furajelor, se recomandă să se cearnă în prealabil la 1 mm furajele sub formă de pelete și grăunțele și apoi să se pregătească, să se analizeze și să se raporteze separat cele două fracțiuni rezultate, care trebuie să fie considerate ca eșantioane distincte. ◀2.1.3.3.3. Subeșantionarea și măcinarea: cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate.2.1.3.3.4. Extragerea și prepararea sedimentului: o porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat este transferată în pâlnia de separare sau în paharul de sedimentare cu fund conic și se adaugă 50 ml de tetracloretilenă. Porțiunea transferată în pâlnie este limitată la 3 g în cazul făinii de pește sau al altor produse de origine animală pure, ingrediente minerale sau preamestecuri care generează sedimente în proporție de peste 10 %. Amestecul se scutură energic cel puțin 30 de secunde și se mai adaugă cu atenție cel puțin 50 ml de tetracloretilenă în timp ce se spală suprafața interioară a pâlniei pentru a îndepărta orice urmă de particule. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin cinci minute înainte de a separa sedimentul prin deschiderea robinetului.

Dacă se utilizează un pahar de sedimentare cu fund conic, se agită energic amestecul cel puțin 15 secunde și particulele care rămân pe pereții paharului sunt spălate cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de tetracloretilenă curată. Amestecul se lasă să stea 3 minute și apoi se agită din nou 15 secunde, iar particulele care rămân pe pereții paharului sunt spălate cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de tetracloretilenă curată. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute și apoi fracțiunea lichidă se înlătură și se elimină prin decantare atentă, având grijă să nu se piardă nimic din sediment.



▼ **M7**

Sedimentul se colectează într-un filtru de hârtie plasat într-o pâlnie pentru a permite separarea restului de TCE, evitându-se în același timp depunerile de grăsime în sediment. Sedimentul se usucă. Se recomandă cântărirea ulterioară a sedimentului (cu o precizie de 0,001 g) pentru a controla etapa de sedimentare. În fine, sedimentul se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară.

▼ **M2**

- 2.1.3.3.5. Extragerea și prepararea rezidului de flotație: după recuperarea sedimentului prin metoda descrisă mai sus, ar trebui să rămână două faze în pâlnia de separare: una lichidă constând în tetracloretilenă și una solidă alcătuită din material care plutește. Această fază solidă este reziduul de flotație care se recuperează turnând toată tetracloretilena din pâlnie prin deschiderea robinetului. Prin răsturnarea pâlniei de separare, reziduul de flotație este transferat într-o placă Petri mare și uscat la aer într-o hotă de tiraj. Dacă peste 5 % din reziduul de flotație constă în particule > 0,50 mm, se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.
- 2.1.3.3.6. Pregătirea materiei prime: se pregătește o porțiune de cel puțin 5 g de subeșantion măcinat. Dacă peste 5 % din materie constă în particule > 0,50 mm, se cerne la 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.
- 2.1.3.4. Pregătirea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri
- Pentru pregătirea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri se aplică următorul protocol:
- dacă grăsimea este solidă, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă;
  - cu ajutorul unei pipete, 40 ml de grăsime sau ulei se transferă din partea inferioară a eșantionului într-un tub de centrifugă;
  - se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 r.p.m.;
  - dacă grăsimea este solidă după centrifugare, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă;
  - se repetă centrifugarea timp de 5 minute la 4 000 r.p.m.;
  - cu ajutorul unei linguri mici sau al unei spatule, jumătate din impuritățile decantate sunt transferate spre examinare către lame microscopice; se recomandă glicerolul ca mediu de montare;
  - impuritățile rămase se utilizează pentru prepararea sedimentului astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.3.
- 2.1.3.5. Utilizarea agenților de colorare
- Pentru a facilita identificarea corectă a constituenților de origine animală, operatorul poate utiliza agenți de colorare în timpul pregătirii eșantioanelor, în conformitate cu orientările emise de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.
- În cazul în care se utilizează soluție de roșu de alizarină pentru colorarea sedimentelor, se aplică următorul protocol:
- sedimentul uscat se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze aproximativ 1 minut și 30 de secunde și se elimină prin turnare);
  - sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu. Se permite ca reacția să continue 10 minute. Tubul se umple cu apă, sedimentul se lasă să se decanteze 2-3 minute, iar apa și particulele în suspensie se elimină ușor prin turnare;

▼ M2

- sedimentul se mai clătește de două ori cu aproximativ 10 ml de apă (se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, se lasă să se decanteze și se elimină apa prin turnare de fiecare dată);
- se adaugă între 2 și 10 picături de soluție de roșu de alizarină, iar amestecul se agită. Se permite desfășurarea reacției timp de 30 de secunde și sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol, apoi o dată cu acetonă (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solutul se lasă să se decanteze aproximativ 1 minut și se elimină prin turnare);
- sedimentul colorat se usucă.

2.1.4. *Examinare microscopică*

2.1.4.1. Pregătirea lamelor

▼ M7

Lamele microscopice se pregătesc din sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie din reziduu de flotație, fie din materie primă.

▼ M2

Se pregătește un număr suficient de lame pentru a se asigura că se poate efectua un protocol complet de examinare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.4.2.

Lamele microscopice se montează cu mediul de montare adecvat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Lamele se acoperă cu lame de acoperire.

▼ M7

2.1.4.2. Diagrama de observare pentru detectarea particulelor animale în furajele combinate și materiile prime furajere

Lamele microscopice pregătite se observă în conformitate cu diagramele de observare stabilite în diagramele 1 și 2.

Observațiile microscopice se realizează utilizând microscopul compus pe sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie pe reziduu de flotație, fie pe materia primă. Microscopul stereoscopic poate fi utilizat în plus față de microscopul compus pentru fracțiunile grosiere. Fiecare lamă se examinează în întregime la diferite amplificări. Explicații precise cu privire la modul de utilizare a diagramelor de observare sunt detaliate printr-o PSO stabilită de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicată pe site-ul internet al acestuia.

Numărul minim de lame care trebuie observate în fiecare etapă a diagramelor de observare trebuie să fie strict respectat, cu excepția cazului în care întregul material al fracțiunii nu permite să se ajungă la numărul prevăzut de lame, de exemplu atunci când nu este obținut niciun sediment. Nu se utilizează mai mult de 6 lame pentru fiecare determinare pentru înregistrarea numărului de particule.

Atunci când se prepară lame suplimentare pe reziduu de flotație sau pe materia primă utilizând un mediu de montare mai specific cu proprietăți de colorare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.2.1.4, pentru a caracteriza suplimentar structurile (de exemplu pene, fire de păr, mușchi sau particule de sânge) care au fost detectate pe lame pregătite de alte medii de montare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.2.1.3, numărul de particule se calculează pe baza unui număr de maximum 6 lame pentru fiecare determinare, inclusiv lamele suplimentare cu un mediu de montare mai specific.

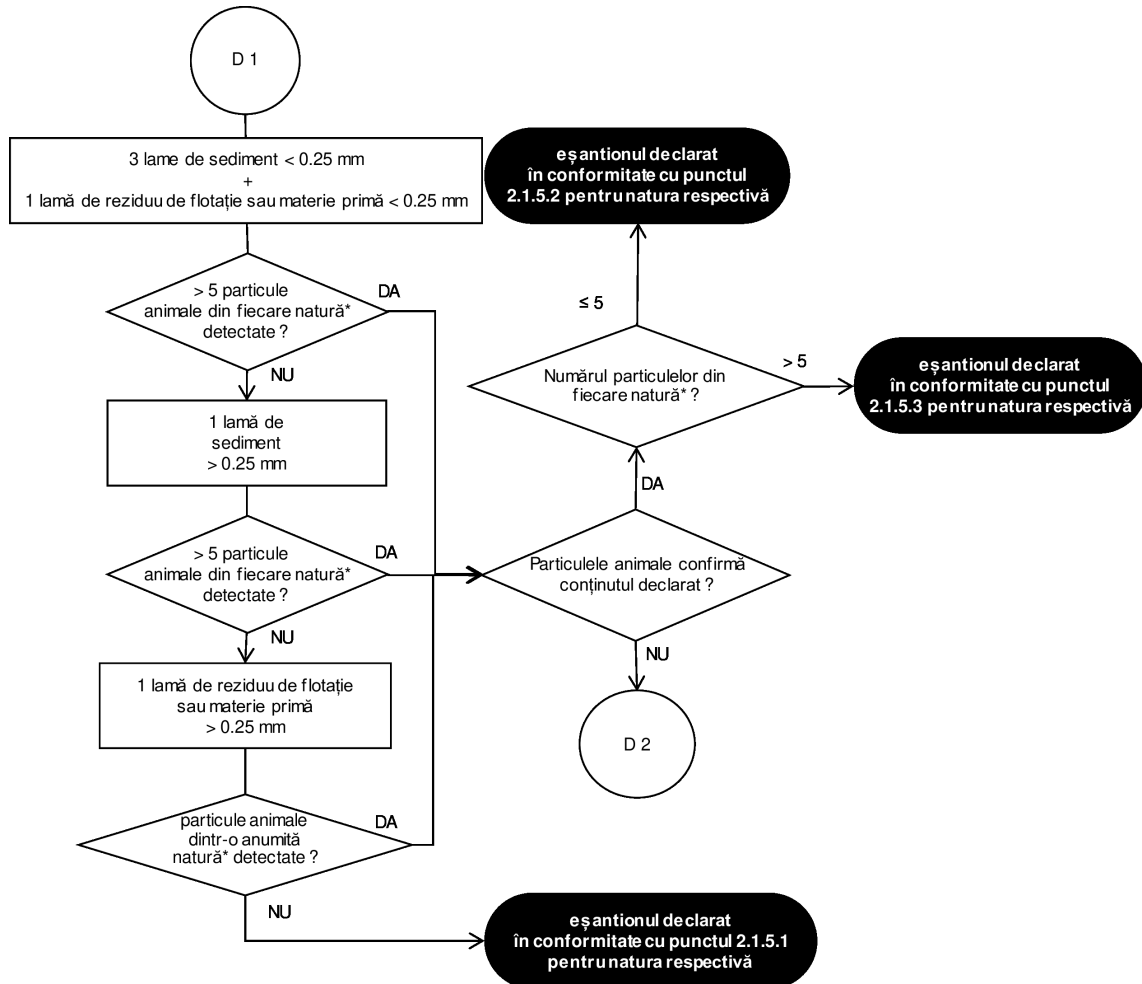
Pentru a facilita identificarea naturii și originii particulelor, operatorul poate utiliza instrumente de sprijin cum ar fi sisteme de asistare în luarea deciziilor, biblioteci de imagini și eşantioane de referință.

▼ M7

Diagrama 1

**Diagrama de observare pentru detectarea particulelor animale în furajele combinate și materiile prime furajere pentru prima determinare**

(D1 și D2 se referă la prima și a doua determinare; \*: vertebrate terestre, pești)

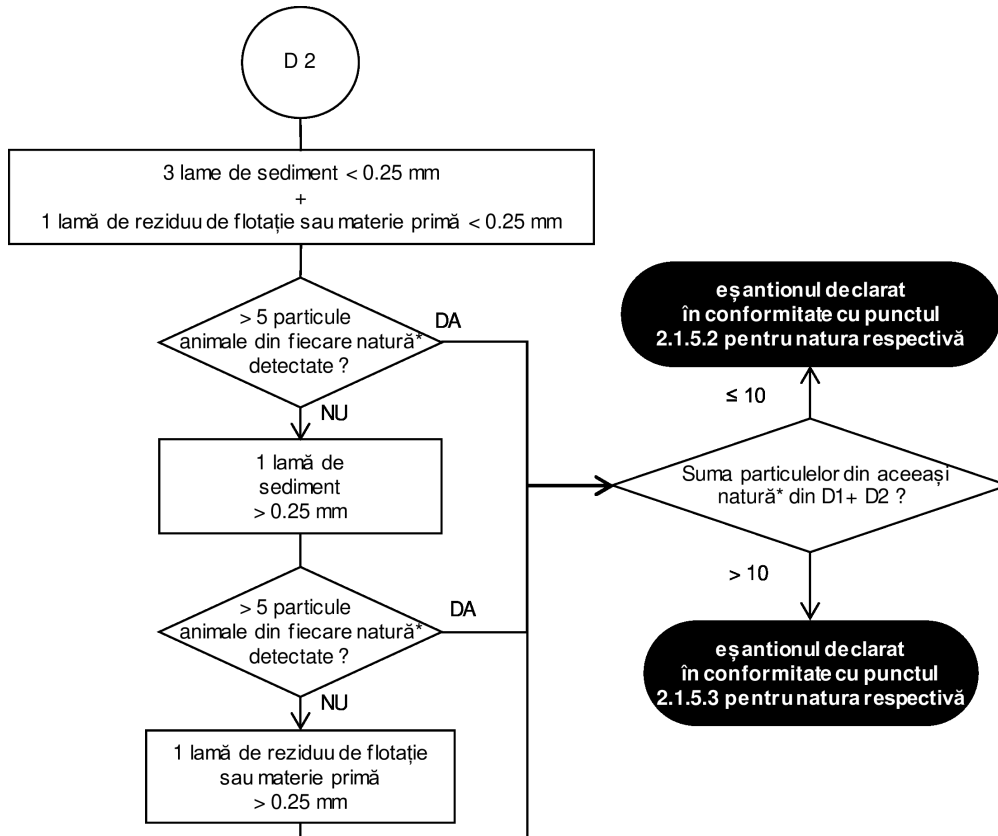


▼ M7

Diagrama 2

**Diagrama de observare pentru detectarea particulelor animale în furajele combinate și materiile prime furajere pentru a doua determinare**

(D1 și D2 se referă la prima și a doua determinare; \*: vertebrate terestre, pești)



▼ **M2**2.1.4.3. ► **M7** Numărul de determinări

Determinările se efectuează pe subeșantioane diferite de 50 g fiecare.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare stabilită în diagrama 1, nu sunt detectate particule animale, nu este necesară nicio determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.1.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare stabilită în diagrama 1, se detectează una sau mai multe particule animale de o anumită natură (și anume, vertebrate terestre sau pești), iar natura particulelor găsite confirmă conținutul declarat al eșantionului, nu este necesară o a doua determinare. Dacă numărul particulelor animale de o anumită natură detectate pe parcursul acestei prime determinări este mai mare de 5, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.3. Altfel, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.2.

În alte cazuri, inclusiv atunci când nu a fost furnizată laboratorului nicio declarație de conținut, se efectuează o a doua determinare pomind de la un nou subeșantion.

Dacă, în urma celei de a doua determinări, efectuate în conformitate cu diagrama de observare stabilită în diagrama 2, suma particulelor animale de o anumită natură detectate pe parcursul celor două determinări este mai mare de 10, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.3. Altfel, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând terminologia stabilită la punctul 2.1.5.2. ◀

2.1.5. ► **M7** Exprimarea rezultatelor

Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică tipul de material care a fost analizat (sediment, reziduu de flotajie sau materie primă). Raportarea indică în mod clar numărul de determinări care au fost efectuate și dacă cernerea fracțiunilor înainte de pregătirea lamelor, în conformitate cu ultimul paragraf de la punctul 2.1.3.3.4, nu a fost efectuată.

Raportul laboratorului conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din vertebrate terestre și din pești.

Diferitele situații se raportează în modul următor:

## 2.1.5.1. Nicio particulă animală de o anumită natură detectată:

— „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu a fost detectată nicio particulă derivată din vertebrate terestre.”

— „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu a fost detectată nicio particulă derivată din pești.”

▼ M2

2.1.5.2. Între 1 și 5 particule animale de o anumită natură detectate, în cazul în care a fost efectuată o singură determinare, sau între 1 și 10 particule de o anumită natură detectate în cazul efectuării a două determinări (numărul de particule detectate este sub limita de decizie stabilită în procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia <sup>(1)</sup>) :

În cazul în care s-a efectuat o singură determinare:

- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din vertebre terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...]. Această prezență scăzută se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă microscopică.”
- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilagiu, mușchi, otolit, branhii...]. Această prezență scăzută se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă microscopică.”

Atunci când au fost efectuate două determinări:

- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate din vertebre terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...]. Această prezență scăzută se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă microscopică.”
- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat nu au fost detectate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate din pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilagiu, mușchi, otolit, branhii...]. Această prezență scăzută se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă microscopică.”

De asemenea:

- În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost detectate particulele animale, întrucât detectarea particulelor animale numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.
- Atunci când se detectează doar particule animale care nu pot fi clasificate ca vertebre terestre sau pești (de exemplu fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule animale au fost detectate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebre terestre.

2.1.5.3. Mai mult de 5 particule animale de o anumită natură detectate atunci când s-a efectuat o singură determinare sau mai mult de 10 particule de o anumită natură detectate în cazul a două determinări:

<sup>(1)</sup> <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

În cazul în care s-a efectuat o singură determinare:

- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din vertebre terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...].”
- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate mai mult de 5 particule derivate din pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilagiu, mușchi, otolit, branhii...].”

Atunci când au fost efectuate două determinări:

- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate din vertebre terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilagiu, mușchi, păr, coarne ...].”
- „în măsura în care a fost perceptibil la microscopul optic, în eșantionul prezentat au fost detectate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate din pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilagiu, mușchi, otolit, branhii...].”

De asemenea:

- În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost detectate particulele animale, întrucât detectarea particulelor animale numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.
- Atunci când se detectează doar particule animale care nu pot fi clasificate ca vertebre terestre sau pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule animale au fost detectate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebre terestre. ◀

## 2.2. PCR

### 2.2.1. *Principiu*

Fragmentele de acid dezoxiribonucleic (ADN) de origine animală care pot fi prezente în materiile prime furajere și furajele combinate sunt detectate printr-o tehnică de amplificare genetică prin PCR, care vizează secvențe de ADN specifice speciei.

Metoda PCR necesită, în primul rând, o etapă de extragere a ADN-ului. Etapa de amplificare se aplică ulterior extractului de ADN astfel obținut, în vederea detectării speciilor de animale vizate de test.

### 2.2.2. *Reactivi și echipamente*

#### 2.2.2.1. Reactivi

##### 2.2.2.1.1. Reactivi pentru etapa de extragere a ADN-ului

Se utilizează numai reactivii aprobați de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicați pe site-ul internet al acestuia.

##### 2.2.2.1.2. Reactivi pentru etapa de amplificare genetică

▼ **M2**

## 2.2.2.1.2.1. Primeri și sonde

Se utilizează numai primerii și sondele cu secvențe de oligonucleotide validate de către laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale <sup>(1)</sup>.

## 2.2.2.1.2.2. Amestecul principal

Se utilizează doar soluțiile de amestec principal care nu conțin reactivi susceptibili să conducă la rezultate false datorită prezenței de ADN animal <sup>(2)</sup>.

## 2.2.2.1.2.3. Reactivi de decontaminare

## 2.2.2.1.2.3.1. Soluție de acid clorhidric (0,1N)

## 2.2.2.1.2.3.2. Înălbitor (soluție de hipoclorit de sodiu la 0,15 % din clor activ)

## 2.2.2.1.2.3.3. Reactivi necorozivi pentru decontaminarea dispozitivelor costisitoare, precum balanțele analitice (de exemplu, DNA Erase™ al MP Biomedicals)

## 2.2.2.2. Echipamente

## 2.2.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g

## 2.2.2.2.2. Echipament de măcinare

## 2.2.2.2.3. Thermocycler care permite PCR în timp real

## 2.2.2.2.4. Microcentrifugă pentru tuburi de microcentrifugare

## 2.2.2.2.5. Set de micropipete care permit introducerea cu pipeta de la 1 μl până la 1 000 μl

## 2.2.2.2.6. Material de plastic standard de biologie moleculară: tuburi de microcentrifugare, vârfuri de plastic filtrate pentru micropipete, plăci adecvate pentru thermocycler.

## 2.2.2.2.7. Congelatoare pentru depozitarea eșantioanelor și reactivilor

2.2.3. *Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor*

## 2.2.3.1. Eșantionare

Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa I.

## 2.2.3.2. Pregătirea eșantioanelor

Pregătirea eșantioanelor de laborator înainte de extragerea ADN-ului respectă cerințele prevăzute în anexa II. Cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate.

Pregătirea eșantioanelor se efectuează într-o încăpere diferită de cele dedicate extragerii ADN-ului și reacțiilor de amplificare genetică descrise în ISO 24276.

Se pregătesc două porțiuni de testat de cel puțin 100 mg fiecare.

2.2.4. *Extragerea ADN-ului*

Extragerea ADN-ului se efectuează pe fiecare porțiune de testat pregătită utilizând PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.

Se pregătesc două controale de extragere pentru fiecare serie de extrageri descrise în ISO 24276:

— un control martor de extragere;

— un control de extragere al ADN-ului pozitiv.

<sup>(1)</sup> Lista acestor primeri și sonde pentru fiecare specie de animale vizată de testare este disponibilă pe site-ul internet al laboratorului de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale.

<sup>(2)</sup> Exemple de amestecuri principale care sunt funcționale sunt disponibile pe site-ul internet al laboratorului de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale.



**▼ M2**2.2.5. *Amplificarea genetică*

Amplificarea genetică se efectuează utilizând metodele validate pentru fiecare specie care necesită identificare. Aceste metode sunt prevăzute în PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Fiecare extract de ADN se analizează în cel puțin două diluții diferite în scopul de a evalua inhibarea.

Se pregătesc două controale de amplificare pentru fiecare specie țintă, astfel cum se descrie în ISO 24276.

- se utilizează un control țintă al ADN-ului pozitiv pentru fiecare placă sau serie de teste PCR;
- se utilizează un control al reactivului de amplificare (denumit, de asemenea, control fără etalon) pentru fiecare placă sau serie de teste PCR.

2.2.6. *Interpretarea și exprimarea rezultatelor*

Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică cel puțin greutatea porțiunilor de testat utilizate, tehnica de extragere utilizată, numărul de determinări efectuate și limita de detecție a metodei.

Rezultatele nu sunt interpretate și raportate în cazul în care controlul de extragere al ADN-ului pozitiv și controalele țintă ale ADN-ului pozitiv nu oferă rezultate pozitive pentru obiectivul care face obiectul testului, în timp ce controlul reactivului de amplificare este negativ.

În cazul în care rezultatele celor două porțiuni de testat nu sunt consecvente, se repetă cel puțin etapa de amplificare genetică. În cazul în care laboratorul suspectează că extractele de ADN pot fi cauza inconsecvenței, se efectuează o nouă extracție de ADN și o altă amplificare genetică înainte de interpretarea rezultatelor.

Exprimarea finală a rezultatelor se bazează pe integrarea și interpretarea rezultatelor celor două porțiuni de testat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.

## 2.2.6.1. Rezultat negativ

Un rezultat negativ este raportat după cum urmează:

Niciun ADN de la X nu a fost detectat în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).

## 2.2.6.2. Rezultat pozitiv

Un rezultat pozitiv este raportat după cum urmează:

A fost detectat ADN de la X în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).



## ANEXA VII

**METODĂ DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A HRANEI PENTRU PĂSĂRILE DE CRESCĂTORIE****1. Metoda de calcul și exprimarea valorii energetice**

Valoarea energetică a hranei combinate pentru păsările de crescătorie se calculează aplicându-se formula de mai jos, pe baza procentajului anumitor compuși analitici ai hranei pentru păsările de crescătorie. Această valoare se exprimă în megajouli (MJ) de energie metabolizabilă (EM), corectată pentru azot, per kilogram de furaje combinate:

$$\text{MJ/kg de EM} = 0,1551 \times \% \text{ proteină brută} + 0,3431 \times \% \text{ grăsime brută} + 0,1669 \times \% \text{ amidon} + 0,1301 \times \% \text{ zaharuri totale (exprimate în zaharoză)}.$$

**2. Toleranțe aplicabile valorilor declarate**

În cazul în care la inspecția oficială se constată o diferență (valoare energetică mai mare sau mai mică a hranei pentru păsări) între rezultatul inspecției și valoarea energetică menționată, se admite o toleranță minimă de 0,4 MJ/kg EM.

**3. Exprimarea rezultatului**

Rezultatul obținut prin aplicarea formulei menționate se exprimă cu o zecimală.

**4. Metode de eșantionare și de analiză**

Prelevarea eșantionului din furajele combinate și determinarea conținutului de compuși analitici indicați în metoda de calcul trebuie să se efectueze în conformitate cu metodele comunitare de eșantionare și de analiză pentru controlul oficial al hranei pentru animale.

Se aplică următoarele metode:

- pentru determinarea conținutului de grăsime brută: procedura B a metodei de determinare a uleiurilor și a grăsimilor brute, din anexa III partea H.
- pentru determinarea conținutului de amidon: metoda polarimetrică, din anexa III partea L.



*ANEXA VIII*

**METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL PREZENȚEI ILEGALE ÎN FURAJE A ADITIVILOR CARE NU MAI SUNT AUTORIZAȚI**

*Note importante*

Pentru detectarea prezenței ilegale în furaje a aditivilor care nu mai sunt autorizați se pot utiliza metode de analiză mai sensibile decât cele menționate în prezenta anexă.

Metodele de analiză menționate în prezenta anexă se utilizează în scop de confirmare.

**A. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE METIL BENZOQUAT**

*7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-chinolonă*

**1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului de metil benzoquat din furaje. Limita de cuantificare este de 1 mg/kg.

**2. Principiu**

Se extrage metil benzoquat din eșantion cu ajutorul unei soluții metanolice de acid metansulfonic. Extractul este purificat cu diclormetan, prin cromatografie prin schimb ionic apoi din nou cu diclormetan. Conținutul de metil benzoquat se determină cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

**3. Reactivi**

3.1. Diclormetan.

3.2. Metanol, de calitate HPLC.

3.3. Fază mobilă HPLC

Amestec de metanol (3.2) și apă (de calitate HPLC) 75 + 25 (v + v).

Se trece printr-un filtru de 0,22 μm (4.5) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute).

3.4. Soluție de acid metansulfonic, c = 2 %

Se diluează 20 ml acid metansulfonic până la 1 000 ml, cu metanol (3.2).

3.5. Acid clorhidric, c = 10 %

Se diluează, cu apă, 100 ml acid clorhidric (ρ<sub>20</sub> 1,18 g/ml) până la 1 000 ml.

3.6. Rășină Amberlit schimbătoare de cationi CG-120 (Na), ochiuri 100-200

Rășina se pretratează înainte de utilizare. Se tratează 100 g de rășină cu 500 ml soluție de acid clorhidric (3.5) și se încălzește pe o plită până la fierbere, amestecând continuu. Se lasă să se răcească și se decantează acidul. Se filtrează printr-o hârtie de filtru, sub vid. Se spală rășina de două ori, cu câte 500 ml apă și apoi cu 250 ml metanol (3.2). Se clătește rășina cu încă 250 ml metanol și se usucă trecând un curent de aer prin turta de filtrare. Rășina uscată se păstrează într-o sticlă închisă.

3.7. Substanță etalon: metil benzoquat pur (7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-chinolonă)

**▼B**

## 3.7.1. Soluție etalon stoc de metil benzoquat, 500 µg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de substanță etalon (3.7), se dizolvă în soluție de acid metansulfonic (3.4) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn și se amestecă.

## 3.7.2. Soluție etalon intermediară de metil benzoquat, 50 µg/ml

Se transferă 5 ml de soluție etalon stoc de metil benzoquat (3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu metanol (3.2) și se amestecă.

## 3.7.3. Soluții de calibrare

Se transferă 1, 2, 3, 4, și 5 ml de soluție etalon intermediară de metil benzoquat (3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 25 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (3.3) și se amestecă. Aceste soluții au concentrații de 2, 4, 6, 8 și 10 µg/ml de metil benzoquat. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

**4. Aparatură**

## 4.1. Agitator de laborator.

## 4.2. Evaporator rotativ cu generare de film.

## 4.3. Coloană de sticlă (250 mm × 15 mm) prevăzută cu robinet de închidere și rezervor cu capacitatea aproximativă de 200 ml.

## 4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu grup de diode

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 µm sau echivalent.

## 4.5. Filtre cu membrană, 0,22 µm.

## 4.6. Filtre cu membrană, 0,45 µm.

**5. Procedură**5.1. *Aspecte generale*

## 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența metil benzoquatului și a substanțelor interferente.

## 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de metil benzoquat, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 15 mg/kg, se adaugă 600 µl din soluția etalon stoc (3.7.1) la 20 g de furaj martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (5.2).

*Notă:* Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar metil benzoquatul nu trebuie să fie detectat la analiză.

5.2. *Extracție*

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 20 g din eșantionul preparat și se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se adaugă 100 ml de soluție de acid metansulfonic (3.4) și se agită mecanic (4.1) timp de 30 minute. Se filtrează soluția prin hârtie de filtru și se păstrează filtratul pentru etapa de separare lichid-lichid (5.3).

5.3. *Separarea lichid-lichid*

Într-o pâlnie de separare de 500 ml care conține 100 ml soluție de acid clorhidric (3.5) se transferă 25 ml din filtratul obținut la (5.2). Se adaugă 100 ml diclorometan (3.1) prin pâlnie și se agită timp de 1 minut. Se așteaptă până la separarea straturilor și se scurge stratul inferior (diclorometan) într-un balon cu fundul rotund de 500 ml. Se repetă extracția fazei apoase cu încă două porții de câte 40 ml de diclorometan

**▼B**

și se combină acestea cu primul extract în balonul cu fund rotund. Se evaporă extractul de diclorometan până la uscare pe evaporatorul rotativ (4.2) la presiune scăzută și la temperatură de 40 °C. Se dizolvă reziduu în 20-25 ml metanol (3.2), se închide balonul și se păstrează întregul extract pentru cromatografia prin schimb ionic (5.4).

#### 5.4. *Cromatografia prin schimb ionic*

##### 5.4.1. *Pregătirea coloanei de schimb cationic*

Se introduce un dop de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (4.3). Se prepară o suspensie de 5 g de rășină schimbătoare de cationi tratată (3.6) cu 50 ml acid clorhidric (3.5), se toarnă în coloana de sticlă și se lasă să se sedimenteze. Se îndepărtează acidul în exces până se ajunge aproape de suprafața stratului de rășină și se spală coloana cu apă până când efluentul devine neutru la turnesol. Se transferă 50 ml metanol (3.2) în coloană și se lasă să se dreneze până la suprafața rășinii.

##### 5.4.2. *Cromatografia pe coloană*

Se transferă cu grijă în coloană, utilizând o pipetă, extractul obținut la (5.3). Se clătește balonul cu fund rotund cu două porții de 5-10 ml metanol (3.2) și se transferă lichidele de spălare în coloană. Se toarnă extractul pe suprafața stratului de rășină și se spală coloana cu 50 ml metanol, având grijă ca debitul să nu depășească 5 ml pe minut. Se îndepărtează efluentul. Se eluează metil benzoquatul din coloană folosind 150 ml de soluție de acid metansulfonic (3.4) și se colectează eluatul din coloană într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml.

#### 5.5. *Separarea lichid-lichid*

Se transferă eluatul obținut la (5.4.2) într-o pâlnie de separare de 1 litru. Se clătește flaconul tip Erlenmeyer cu 5-10 ml metanol (3.2) și se combină lichidele de spălare cu conținutul pâlniei de separare. Se adaugă 300 ml soluție de acid clorhidric (3.5) și 130 ml de diclorometan (3.1). Se agită timp de 1 minut și se așteaptă separarea fazelor. Se evacuează stratul inferior (diclorometan) într-un balon cu fundul rotund de 500 ml. Se repetă extracția fazei apoase cu alte două porții de 70 ml de diclorometan și se combină aceste extracte cu primul în balonul cu fund rotund.

Se evaporă extractul de diclorometan până la uscare pe evaporatorul rotativ (4.2) la presiune scăzută și la temperatura de 40 °C. Se dizolvă reziduu din balon cu aproximativ 5 ml de metanol (3.2) și se transferă cantitativ această soluție într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul cu fund rotund cu alte două porții de 1-2 ml metanol, apoi acestea se transferă în balonul gradat. Se completează cu metanol până la semn și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (4.6). Se păstrează această soluție pentru determinarea HPLC (5.6).

#### 5.6. *Determinarea prin HPLC*

##### 5.6.1. *Parametri*

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

- coloană pentru cromatografie lichidă (4.4.1);
- fază mobilă HPLC: amestec metanol-apă (3.3);
- debit: 1-1,5 ml/minut;
- Lungimea unde de detecție: 265 nm;
- volum de injecție: 20-50 μl.

**▼B**

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (3.7.3) conținând 4 µg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

#### 5.6.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

#### 5.6.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (5.5) de mai multe ori, utilizând același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de metil benzoquat.

### 6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de metil benzoquat din soluția de eșantion se determină concentrația în µg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.6.2).

Conținutul de metil benzoquat  $w$  (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

unde:

$c$  = concentrația de metil benzoquat din soluția de eșantion, în µg/ml;  
 $m$  = greutatea porțiunii de testat, în grame.

### 7. Validarea rezultatelor

#### 7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (3.7.3), care conține 10 µg/ml.

#### 7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion se îmbogățește prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție etalon intermediară (3.7.2). Cantitatea de metil benzoquat adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de metil benzoquat din extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de metil benzoquat se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială.

#### 7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;

**▼ B**

(b) între 220 și 350 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru părțile spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;

(c) între 220 și 350 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

### 7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească: 10 % față de rezultatul superior pentru conținutul de metil benzoquat cuprins între 4 și 20 mg/kg.

### 7.3. Recuperare

Pentru un eșantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %.

## 8. Rezultatele unui studiu colaborativ

Cinci eșantioane au fost analizate de 10 laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize.

	Martor	Făină 1	Pelete 1	Făină 2	Pelete 2
Medie (mg/kg)	ND	4,5	4,5	8,9	8,7
$s_r$ (mg/kg)	—	0,3	0,2	0,6	0,5
$CV_r$ (%)	—	6,7	4,4	6,7	5,7
$S_R$ (mg/kg)	—	0,4	0,5	0,9	1
$CV_R$ (%)	—	8,9	11,1	10,1	11,5
Recuperare (%)	—	92	93	92	89

ND = nedetectat;

$s_r$  = deviația standard a repetabilității;

$CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității, %;

$S_R$  = deviația standard a reproductibilității;

$CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității, %.

## B. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE OLAQUINDOX

*2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalină- $N^1, N^4$ -dioxid*

### 1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de olaquindox din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg.

### 2. Principiu

Eșantionul se extrage cu un amestec apă și metanol. Conținutul de olaquindox se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

**▼ B****3. Reactivi**

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, de calitate HPLC.

3.3. Apă, de calitate HPLC.

3.4. Fază mobilă pentru HPLC

Amestec de apă (3.3) și metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

3.5. Substanță etalon: olaquinox pur 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoil]-3-metil-quinoxalină-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid, E 851.

3.5.1. Soluție etalon stoc de olaquinox, 250 μg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de olaquinox (3.5) într-un balon gradat de 200 ml și se adaugă circa 190 ml de apă. Apoi se introduce balonul timp de 20 minute într-o baie cu ultrasunete (4.1). După tratamentul cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se depozitează în frigider. Această soluție trebuie preparată proaspăt în fiecare lună.

3.5.2. Soluție etalon intermediară de olaquinox, 25 μg/ml

Se transferă 10 ml din soluția etalon stoc (3.5.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu fază mobilă (3.4) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se depozitează în frigider. Această soluție trebuie preparată proaspăt în fiecare zi.

3.5.3. Soluții de calibrare

Într-o serie de baloane gradate de 50 ml se transferă 1, 2, 5, 10, 15 și 20 ml din soluția etalon intermediară (3.5.2). Se completează până la semn cu faza mobilă (3.4) și se amestecă. Se împachetează baloanele în folie de aluminiu. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 și, respectiv, 10 μg de olaquinox per ml.

Aceste soluții trebuie preparate proaspăt în fiecare zi.

**4. Aparatură**

4.1. Baie cu ultrasunete.

4.2. Agitator mecanic.

4.3. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungime de undă variabilă sau detector cu grup de diode.

4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 sau echivalent.

4.4. Filtre cu membrană, 0,45 μm.

**5. Procedură**

*Notă:* Olaquinoxul este sensibil la lumină. Toate operațiile se efectuează sub lumină atenuată sau se folosește sticlărie brună.

5.1. *Aspecte generale*

5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența de olaquinox și a substanțelor interferente.

5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor la care s-a adăugat o cantitate de olaquinox, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 50 mg/kg, se transferă 10 ml



**▼B**

de soluție etalon stoc (3.5.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (5.2).

*Notă:* Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul și nu trebuie detectată prezența de olaquinox.

### 5.2. Extracție

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 50 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 1 000 ml, se adaugă 100 ml de metanol (3.1) și se introduce balonul timp de 5 minute în baia cu ultrasunete (4.1). Se adaugă 410 ml de apă și se lasă în baia cu ultrasunete timp de alte 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete, se agită timp de 30 de minute în agitator (4.2) și se filtrează printr-un filtru cutat. Se transferă 10 ml de filtrat într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la semn cu apă și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (4.4) (a se vedea punctul 9, Observații). Se efectuează determinarea prin HPLC (5.3).

### 5.3. Determinarea prin HPLC

#### 5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

#### Coloană analitică (4.3.1)

Fază mobilă (3.4):	amestec de apă (3.3) și de metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)
Debit:	1,5-2 ml/minut
Lungimea unde de detecție:	380 nm
Volum de injecție:	20-100 μl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (3.5.3) care conține 2,5 μg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

#### 5.3.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.5.3) de mai multe ori și se determină valorile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

#### 5.3.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (5.2) de mai multe ori folosind același volum ca și cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (suprafața) medie a vârfurilor de olaquinox.

## 6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de olaquinox din soluția de eșantion se determină concentrația în μg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare. (5.3.2).

Conținutul  $w$  de olaquinox al eșantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

**▼B**

unde:

c = concentrația de olaquinox din extractul de eșantion (5.2) în  $\mu\text{g/ml}$ ;

m = greutatea porțiunii de testat, în g (5.2).

## 7. Validarea rezultatelor

### 7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode prin care se compară spectrul extractului de eșantion (5.2) și cel al soluției de calibrare (3.5.3), conținând 5  $\mu\text{g/m}$ .

#### 7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (5.2) se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (3.5.3). Cantitatea de olaquinox adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de olaquinox detectată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de olaquinox se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze într-o variație de  $\pm 10\%$  din lărgimea inițială a vârfului de olaquinox al extractului de eșantion neîmbogățit.

#### 7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie identică într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de  $\pm 2\text{ nm}$ ;
- (b) între 220 și 400 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța analitului etalon;
- (c) între 220 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, punctului maxim și curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

### 7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % față de valoarea superioară, pentru conținuturile de olaquinox cuprinse între 10 și 200 mg/kg.

### 7.3. Recuperare

Pentru un eșantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %.

**▼ B****8. Rezultatele unui studiu colaborativ**

La nivelul CE a fost organizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate patru eșantioane de hrană pentru porci, inclusiv un eșantion martor, de către 13 laboratoare. Rezultatele sunt prezentate mai jos:

	Eșantion 1	Eșantion 2	Eșantion 3	Eșantion 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
medie (mg/kg)	—	14,6	48	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
Conținut nominal (mg/kg)	—	15	50	100
recuperare %	—	97,3	96	95,4

L = număr de laboratoare;  
n = număr de valori unice;  
 $s_r$  = deviația standard a repetabilității;  
 $S_R$  = deviația standard a reproductibilității;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității.

**9. Observație**

Cu toate că metoda nu a fost validată pentru furajele care conțin peste 100 mg/kg de olaquinox, este posibil să se obțină rezultate satisfăcătoare prin folosirea unui eșantion cu o greutate mai mică și/sau prin diluarea extractului (5.2) pentru a atinge o concentrație situată în intervalul curbei de calibrare (5.3.2).

**C. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE AMPROLIUM**

*Clorhidrat de clorură de 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridină*

**1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului de amprolium din furaje și premixuri. Limita de detecție este de 1 mg/kg, limita de cuantificare este de 5 mg/kg.

**2. Principiu**

Eșantionul este extras cu un amestec de metanol și apă. După diluarea cu fază mobilă și filtrarea prin membrană, conținutul de amprolium se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu schimb de cationi, utilizând un detector UV.

**3. Reactivi**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, de calitate HPLC.

3.3. Apă, de calitate HPLC.

3.4. Soluție de fosfat diacid de sodiu,  $c = 0,1$  mol/l

Se dizolvă 13,8 g de fosfat diacid de sodiu în apă (3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.3) și se amestecă.

3.5. Soluție de perclorat de sodiu,  $c = 1,6$  mol/l

Se dizolvă 224,74 g de perclorat de sodiu monohidrat în apă (3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.3) și se amestecă.

**▼ B**

- 3.6. Fază mobilă pentru HPLC (a se vedea observația de la 9.1)

Amestec de acetonitril (3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (3.4) și soluție de perclorat de sodiu (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Înainte de utilizare, se filtrează printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm (4.3) și se degazează soluția [de exemplu, într-o baie cu ultrasunete (4.4) timp de cel puțin 15 minute].

- 3.7. Substanță etalon: amprolium pur, clorhidrat de clorură de 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridină, E 750 (a se vedea 9.2)

- 3.7.1. Soluție etalon stoc de amprolium, 500 μg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de amprolium (3.7) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în 80 ml de metanol (3.1) și se plasează balonul timp de 10 minute într-o baie cu ultrasunete (4.4). După tratamentul cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. La o temperatură ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

- 3.7.2. Soluție etalon intermediară de amprolium, 50 μg/ml

Se pipetează 5 ml din soluția etalon stoc (3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu solvent de extracție (3.8) și se amestecă. La o temperatură ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

- 3.7.3. Soluții de calibrare

Se transferă 0,5, 1 și 2 ml din soluția etalon intermediară (3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (3.6) și se amestecă. Aceste soluții corespund la 0,5, 1 și respectiv 2 μg de amprolium per ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare.

- 3.8. Solvent de extracție

Amestec de metanol (3.1) și apă 2 + 1 (v + v).

#### 4. Aparatură

- 4.1. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 100 μl

- 4.1.1. Coloană pentru cromatografie lichidă de 125 mm x 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 μm sau echivalent.

- 4.1.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode.

- 4.2. Filtru cu membrană, material PTFE, de 0,45 μm.

- 4.3. Filtru cu membrană, 0,22 μm.

- 4.4. Baie cu ultrasunete.

- 4.5. Agitator mecanic sau magnetic.

#### 5. Procedură

- 5.1. Aspecte generale

- 5.1.1. Furaș martor

Pentru efectuarea testului de recuperare (5.1.2), se analizează un furaș martor pentru a verifica absența de amprolium și a substanțelor interferente. Furașul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze amprolium sau substanțe interferente.

**▼B**

## 5.1.2 Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de amprolium similară celei prezente în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10 ml de soluție etalon stoc (3.7.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adăugare standard a etalonului. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de amprolium similară cu cea deja prezentă în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit și recuperarea poate fi calculată prin scădere.

## 5.2. Extracție

## 5.2.1. Premixuri (conținut de amprolium &lt; 1 %) și furaje

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, între 5 și 40 g de eșantion, în funcție de conținutul de amprolium, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml de solvent de extracție (3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de o oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (3.6), pentru a se obține un conținut de amprolium între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă (a se vedea observația de la 9.3). Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

## 5.2.2. Premixuri (conținut de amprolium ≥ 1 %)

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 1-4 g de premix, în funcție de conținutul de amprolium, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml solvent de extracție (3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de o oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (3.6), pentru a se obține un conținut de amprolium între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă. Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

## 5.3. Determinarea prin HPLC

## 5.3.1. Parametri:

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Fază mobilă (3.6):	amestec de acetonitril (3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (3.4) și soluție de perclorat de sodiu (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Debit:	0,7-1 ml/minut
Lungimea unde de detecție:	264 nm
Volum de injecție:	100 μl

**▼B**

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (3.7.3) care conține 1 µg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

## 5.3.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

## 5.3.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (5.2) de mai multe ori folosind același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amprolium.

## 6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amprolium din soluția de eșantion se determină concentrația în µg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.3.2).

Conținutul *w* de amprolium al eșantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

unde:

*V* = volumul solventului de extracție (3.8), în ml, conform 5.2 (adică 200 ml);

*c* = concentrația de amprolium din extractul de eșantion (5.2), în µg/ml;

*f* = factorul de diluție conform 5.2;

*m* = greutatea porțiunii de testat, în g.

## 7. Validarea rezultatelor

## 7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (3.7.3), care conține 2 µg/ml.

## 7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (5.2) se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (3.7.3). Cantitatea de amprolium adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de amprolium constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de amprolium se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze într-o variație de ± 10 % din lărgimea inițială a vârfului de amprolium din extractul de eșantion neîmbogățit.

## 7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de ± 2 nm;

**▼B**

- (b) între 210 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;
- (c) între 210 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, punctului maxim și curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

- 15 % din rezultatul superior pentru un conținut de amprolium situat între 25 și 500 mg/kg;
- 75 mg/kg pentru un conținut de amprolium situat între 500 și 1 000 mg/kg;
- 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de amprolium mai mare de 1 000 mg/kg.

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate trei tipuri de hrană pentru păsări de crescătorie (eșantioanele 1-3), un furaj mineral (eșantionul 4) și un premix (eșantionul 5). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion 1 (furaj martor)	Eșantion 2	Eșantion 3	Eșantion 4	Eșantion 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medie (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
$s_r$ (mg/kg)	—	2,26	3,57	178	550
$CV_r$ (%)	—	4,95	1,9	3,46	2,2
$S_R$ (mg/kg)	—	2,95	11,8	266	760
$CV_R$ (%)	—	6,47	6,27	5,19	3
conținut nominal (mg/kg)	—	50	200	5 000	25 000

- L = număr de laboratoare;  
n = număr de valori unice;  
 $s_r$  = deviația standard a repetabilității;  
 $CV_r$  = coeficientul de variație a repetabilității;  
 $S_R$  = deviația standard a reproductibilității;  
 $CV_R$  = coeficientul de variație a reproductibilității.

**▼ B****9. Observații**

- 9.1. Dacă eșantionul conține tiamină, vârful tiaminei din cromatogramă apare puțin înaintea vârfului amproliumului. Conform acestei metode, amproliumul și tiamina trebuie să fie separate. Dacă amproliumul și tiamina nu sunt separate de coloana (4.1.1) utilizată în această metodă, se înlocuiește cu metanol până la 50 % din porția de acetonitril a fazei mobile (3.6).
- 9.2. Conform Farmacopeei Britanice, spectrul soluției de amproliu ( $c = 0,02$  mol/l) în acid clorhidric ( $c = 0,1$  mol/l) prezintă valori maxime la 246 nm și 262 nm. Absorbanța este de 0,84 la 246 nm și de 0,8 la 262 nm.
- 9.3. Extractul trebuie să fie întotdeauna diluat cu faza mobilă, altfel timpul de reținere al vârfului de amprolium se poate schimba în mod semnificativ din cauza variațiilor forței ionice.

**D. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CARBADOX**

*Metil 3-(2-quinoxalinimetilenă)carbazat  $N^1, N^4$ -dioxid*

**1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite determinarea conținutului de carbadox din furaje, premixuri și preparate. Limita de detecție este de 1 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 5 mg/kg.

**2. Principiu**

Proba se echilibrează cu apă și se extrage cu metanol-acetonitril. Pentru furaje, o parte alicotă din extrasul filtrat se supune purificării pe o coloană de oxid de aluminiu. Pentru premixuri și preparate, o parte alicotă din extrasul filtrat se diluează la o concentrație adecvată cu apă, metanol și acetonitril. Conținutul de carbadox se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector UV.

**3. Reactivi**

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Acetonitril, de calitate HPLC.
- 3.3. Acid acetic,  $w = 100 \%$ .
- 3.4. Oxid de aluminiu: neutru, grad de activitate I.
- 3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v)

Se amestecă 500 ml de metanol (3.1) cu 500 ml de acetonitril (3.2).

- 3.6. Acid acetic,  $\sigma = 10 \%$

Se diluează 10 ml de acid acetic (3.3) cu apă până la 100 ml.

- 3.7. Acetat de sodiu.

- 3.8. Apă, de calitate HPLC.

- 3.9. Soluție tampon de acetat,  $c = 0,01$  mol/l,  $\text{pH} = 6$

Se dizolvă 0,82 g acetat de sodiu (3.7) în 700 ml apă (3.8) și se ajustează pH-ul la 6 cu acid acetic (3.6). Se transferă într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (3.8) și se amestecă.

- 3.10. Fază mobilă pentru HPLC

Se amestecă 825 ml de soluție tampon de acetat (3.9) cu 175 ml de acetonitril (3.2).

Se filtrează printr-un filtru de  $0,22 \mu\text{m}$  (4.5) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute).



**▼B**

## 3.11. Substanța etalon

Carbadox pur: metil 3-(2-quinoxalinilmetilenă)carbazat N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid, E 850

## 3.11.1. Soluție etalon stoc de carbadox, 100 µg/ml (a se vedea nota 5, Procedură):

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de carbadox (3.11) într-un balon gradat de 250 ml. Se dizolvă într-un amestec de metanol-acetonitril (3.5) prin ultrasonare (4.7). După tratament cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

## 3.11.2. Soluții de calibrare

Se transferă 2, 5, 10 și 20 ml din soluția etalon stoc (3.11.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se adaugă 30 ml de apă, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Se împachetează baloanele în folie de aluminiu. Aceste soluții corespund valorilor de 2, 5, 10 și 20 µg/ml de carbadox.

Soluțiile de calibrare se prepară imediat înainte de utilizare.

*Notă:* Pentru determinarea conținutului de carbadox din furajele care conțin mai puțin de 10 mg/kg, trebuie pregătite soluții de calibrare cu concentrații mai mici de 2 µg/ml.

## 3.12. Amestec de apă-[metanol-acetonitril] (3.5), 300 + 700 (v + v)

Se amestecă 300 ml de apă cu 700 ml de amestec de metanol-acetonitril (3.5).

## 4. Aparatură

## 4.1. Agitator de laborator sau magnetic.

## 4.2. Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă).

## 4.3. Coloană de sticlă (lungime 300-400 mm, diametru intern aproximativ 10 mm), cu frită de sticlă sinterizată și valvă de evacuare.

*Notă:* Poate fi utilizată, de asemenea, o coloană de sticlă prevăzută cu un robinet sau o coloană de sticlă cu o extremitate efilată; în acest caz, se introduce un dop mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei și se împinge utilizând o baghetă de sticlă.

## 4.4. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 20 µl

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 µm sau echivalent.

## 4.4.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode care funcționează în intervalul 225-400 nm.

## 4.5. Filtru cu membrană, 0,22 µm.

## 4.6. Filtru cu membrană, 0,45 µm.

## 4.7. Baie cu ultrasunete.

**▼B****5. Procedură**

*Notă:* Carbadoxul este fotosensibil. Toate operațiile se efectuează în lumină atenuată sau prin utilizarea de sticlărie de culoare brună sau de sticlărie ambalată în folie de aluminiu.

**5.1. Aspecte generale****5.1.1. Furaj martor**

Pentru a efectua testul de recuperare (5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența carbadoxului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; trebuie să nu se detecteze carbadox sau substanțe interferente.

**5.1.2. Test de recuperare**

Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor (5.1.1) care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de carbadox, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 50 mg/kg, se transferă 5 ml din soluția etalon stoc (3.11.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 200 ml. Se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 10 g din furajul martor, se amestecă și se așteaptă timp de 10 minute înainte de a se trece la etapa de extracție (5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adăugare standard a etalonului. În acest caz, eșantionul este îmbogățit cu o cantitate de carbadox similară celei deja prezente în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea poate fi calculată prin diferență.

**5.2. Extracție****5.2.1. Furaie**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, 10 g de eșantion și se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 200 ml. Se adaugă 15 ml de apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 35 ml de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se agită timp de 30 de minute cu agitatorul mecanic sau magnetic (4.1). Se filtrează soluția printr-o hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2). Se conservă această soluție pentru etapa de purificare (5.3).

**5.2.2. Premixuri (0,1-2 %)**

Se cântărește, cu o abatere de 0,001 g, 1 g de eșantion nemăcinat și se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 200 ml. Se adaugă 15 ml de apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 35 ml de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se agită timp de 30 de minute cu agitatorul mecanic sau magnetic (4.1). Se filtrează soluția printr-o hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2).

Se pipetează o parte alicotă de filtrat într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 15 ml de apă, se completează până la semn cu metanol-acetonitril (3.5) și se amestecă. Concentrația de carbadox a soluției finale este de aproximativ 10 μg/ml. O parte alicotă este filtrată printr-un filtru de 0,45 μm (4.6).

Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.4).

**5.2.3. Preparate (> 2 %)**

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 0,2 g de eșantion nemăcinat și se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se adaugă 45 ml de apă, se amestecă și se echilibrează timp de 5 minute. Se adaugă 105 ml

**▼B**

de metanol-acetonitril (3.5), se astupă și se omogenizează. Eșantionul se supune ultrasunetelor (4.7) timp de 15 minute, urmate de agitare mecanică sau magnetică timp de 15 minute (4.1). Se filtrează soluția printr-o hârtie de filtru din fibră de sticlă (4.2).

Se diluează o parte alicotă de filtrat cu amestecul apă-metanol-acetonitril (3.12) până la o concentrație finală de carbadox de 10-15 μg/ml (pentru un preparat 10 %, factorul de diluție este 10). O parte alicotă se filtrează printr-un filtru de 0,45 μm (4.6).

Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.4).

5.3. *Purificare*

## 5.3.1. Prepararea coloanei de oxid de aluminiu

Se cântăresc 4 g de oxid de aluminiu (3.4) și se transferă în coloana de sticlă (4.3).

## 5.3.2. Purificarea eșantionului

Se introduc 15 ml din extrasul filtrat (5.2.1) în coloana de oxid de aluminiu și se elimină primii 2 ml de eluat. Se colectează următorii 5 ml și se filtrează o parte alicotă printr-un filtru de 0,45 μm (4.6).

Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.4).

5.4. *Determinarea prin HPLC*

## 5.4.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromato- 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particule de 10 μm  
grafie lichidă coloană sau echivalent  
(4.4.1):

Fază mobilă (3.10): Amestec de soluție tampon de acetat (3.9)  
și acetonitril (3.2), 825 + 175 (v + v)

Debit: 1,5-2 ml/minut

Lungimea unde de 365 nm  
dectecție:

Volum de injecție: 20 μl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (3.11.2) conținând 5 μg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

## 5.4.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (3.11.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând valorile sau ariile medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

## 5.4.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion [(5.3.2) pentru furaje, (5.2.2) pentru premixuri și (5.2.3) pentru preparate] de mai multe ori și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de carbadox.

**▼ B****6. Calculul rezultatelor**

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de carbadox din soluția de eșantion se determină concentrația de carbadox, în  $\mu\text{g/ml}$ , a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.4.2).

**6.1. Furaje**

Conținutul de carbadox  $w$  (în  $\text{mg/kg}$ ) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

unde:

$c$  = concentrația de carbadox din extractul de eșantion (5.3.2), în  $\mu\text{g/ml}$ ;

$V_1$  = volumul de extracție, în ml (adică 50);

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g.

**6.2. Premixuri și preparate**

Conținutul de carbadox  $w$  (în  $\text{mg/kg}$ ) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

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

unde:

$c$  = concentrația de carbadox din extractul de eșantion (5.2.2 sau 5.2.3), în  $\mu\text{g/ml}$ ;

$V_2$  = volumul de extracție în ml (adică 50 pentru premixuri și 150 pentru preparate);

$f$  = factorul de diluție conform 5.2.2 (premixuri) sau 5.2.3 (preparate);

$m$  = greutatea porțiunii de testat, în g.

**7. Validarea rezultatelor****7.1. Identitate**

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (3.11.2), care conține 10  $\mu\text{g/ml}$ .

**7.1.1. Co-cromatografie**

Un extract de eșantion este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (3.11.2). Cantitatea adăugată de carbadox trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de carbadox găsită în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de carbadox se mărește după luarea în considerare a cantității adăugate și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială.

**7.1.2. Detecție cu grup de diode**

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este de obicei de  $\pm 2 \text{ nm}$ ;

**▼B**

- (b) între 225 și 400 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să nu fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;
- (c) între 225 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Pentru un conținut de 10 mg/kg și mai mult, diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate șase furaje, patru premixuri și trei preparate de către opt laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. (Informații detaliate privind acest studiu colaborativ figurează în *Journal of AOAC*, vol. 71, 1988, p. 484-490). Rezultatele (cu excepția valorilor aberante) sunt arătate mai jos:

Tabelul 1

**Rezultatele studiului colaborativ pentru furaje**

	Eșantion 1	Eșantion 2	Eșantion 3	Eșantion 4	Eșantion 5	Eșantion 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Medie (mg/kg)	50	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
$s_r$ (mg/kg)	2,9	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
Conținut nominal (mg/kg)	50	50	50	50	50	50

Tabelul 2

**Rezultatele studiului colaborativ pentru premixuri și preparate**

	Premixuri				Preparate		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Medie (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	3	5	4,3	5,2	7,4
$S_R$ (g/kg)	0,37	0,28	0,4	0,55	5,4	6,4	7,7

**▼B**

	Premixuri				Preparate		
	A	B	C	D	A	B	C
CV <sub>R</sub> (%)	4,2	3	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Conținut nominal (g/kg)	10	10	10	10	100	100	100

L = număr de laboratoare;

n = număr de valori unice;

s<sub>r</sub> = deviația standard a repetabilității;

CV<sub>r</sub> = coeficientul de variație a repetabilității;

S<sub>R</sub> = deviația standard a reproductibilității;

CV<sub>R</sub> = coeficientul de variație a reproductibilității.



## ANEXA IX

## TABELE DE CORESPONDENȚĂ MENȚIONATE LA ARTICOLUL 6

1. **Directiva 71/250/CEE**

Directiva 71/250/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1 primul paragraf	Articolul 3
Articolul 1 al doilea paragraf	Articolul 2
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă partea 1	Anexa II
Anexă partea 2	—
Anexă partea 3	—
Anexă partea 4	Anexa III partea O
Anexă partea 5	Anexa III partea M
Anexă partea 6	Anexa III partea N
Anexă partea 7	Anexa III partea Q
Anexă partea 9	Anexa III partea K
Anexă partea 10	—
Anexă partea 11	—
Anexă partea 12	Anexa III partea J
Anexă partea 14	Anexa III partea D
Anexă partea 16	—

2. **Directiva 71/393/CEE**

Directiva 71/393/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă partea I	Anexa III partea A
Anexă partea II	Anexa III partea E
Anexă partea III	Anexa III partea P
Anexă partea IV	Anexa III partea H

3. **Directiva 72/199/CEE**

Directiva 72/199/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Anexa I partea 1	Anexa III partea L
Anexa I partea 2	Anexa III partea C
Anexa I partea 3	—
Anexa I partea 4	—
Anexa I partea 5	Anexa V partea A
Anexa II	—

4. **Directiva 73/46/CEE**

Directiva 73/46/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Anexa I partea 1	Anexa III partea B
Anexa I partea 2	—
Anexa I partea 3	Anexa III partea I

**▼B**5. **Directiva 76/371/CEE**

Directiva 76/371/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 1
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	Anexa I

6. **Directiva 76/372/CEE**

Directiva 76/372/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	—
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	—

7. **Directiva 78/633/CEE**

Directiva 78/633/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă partea 1	—
Anexă partea 2	—
Anexă partea 3	Anexa IV, partea C

8. **Directiva 81/715/CEE**

Directiva 81/715/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	—
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	—

9. **Directiva 84/425/CEE**

Directiva 84/425/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	—
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	—

10. **Directiva 86/174/CEE**

Directiva 86/174/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 4
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	Anexa VII

11. **Directiva 93/70/CEE**

Directiva 93/70/CEE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă	Anexa IV partea D



**▼B****12. Directiva 93/117/CE**

Directiva 93/117/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolele 3 și 5
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Anexă partea 1	Anexa IV partea E
Anexă partea 2	Anexa VIII partea A

**13. Directiva 98/64/CE**

Directiva 98/64/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolele 3 și 5
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Anexă partea A	Anexa III partea F
Anexă partea C	Anexa VIII partea B

**14. Directiva 1999/27/CE**

Directiva 1999/27/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolele 3 și 5
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Articolul 5	—
Articolul 6	—
Articolul 7	—
Anexă partea A	Anexa VIII partea C
Anexă partea B	Anexa IV partea F
Anexă partea C	Anexa VIII partea D

**15. Directiva 1999/76/CE**

Directiva 1999/76/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Anexă	Anexa IV partea G

**16. Directiva 2000/45/CE**

Directiva 2000/45/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Anexă partea A	Anexa IV partea A
Anexă partea B	Anexa IV partea B
Anexă partea C	Anexa III partea G

**▼B**17. **Directiva 2002/70/CE**

Directiva 2002/70/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 1
Articolul 2	Articolele 2 și 3
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Articolul 5	—
Anexa I	Anexa I și anexa V partea B (I)
Anexa II	Anexa II și anexa V partea B (II)

18. **Directiva 2003/126/CE**

Directiva 2003/126/CE	Prezentul regulament
Articolul 1	Articolul 3
Articolul 2	—
Articolul 3	—
Articolul 4	—
Articolul 5	—
Articolul 6	—
Anexă	Anexa VI