

Jurnalul Oficial

L 54

al Uniunii Europene



Ediția în limba română

Legislație

Anul 52

26 februarie 2009

Cuprins

I *Acte adoptate în temeiul Tratatelor CE/Euratom a căror publicare este obligatorie*

REGULAMENTE

- ★ **Regulamentul (CE) nr. 152/2009 al Comisiei din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽¹⁾ 1**

Aviz cititorilor (A se vedea coperta a treia)

Preț: 26 EUR

⁽¹⁾ Text cu relevanță pentru SEE

RO

Actele ale căror titluri sunt tipărite cu caractere drepte sunt acte de gestionare curentă adoptate în cadrul politicii agricole și care au, în general, o perioadă de valabilitate limitată.

Titlurile celorlalte acte sunt tipărite cu caractere aldine și sunt precedate de un asterisc.

I

(Acte adoptate în temeiul Tratatelor CE/Euratom a căror publicare este obligatorie)

REGULAMENTE

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)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 882/2004 al Parlamentului European și al Consiliului din 29 aprilie 2004 privind controalele oficiale efectuate pentru a asigura verificarea conformității cu legislația privind hrana pentru animale și produsele alimentare și cu normele de sănătate animală și de bunăstare a animalelor ⁽¹⁾, în special articolul 11 alineatul (4) literele (a), (b) și (c),

întrucât:

(1) Următoarele acte au fost adoptate în vederea punerii în aplicare a Directivei 70/373/CEE și rămân în vigoare în conformitate cu articolul 61 alineatul (2) din Regulamentul (CE) nr. 882/2004:

- Prima Directivă 71/250/CEE a Comisiei din 15 iunie 1971 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽²⁾;
- A doua Directivă 71/393/CEE a Comisiei din 18 noiembrie 1971 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽³⁾;
- A treia Directivă 72/199/CEE a Comisiei din 27 aprilie 1972 de stabilire a unor metode comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁴⁾;

— A patra Directivă 73/46/CEE a Comisiei din 5 decembrie 1972 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁵⁾;

— Prima Directivă 76/371/CEE a Comisiei din 1 martie 1976 de stabilire a modalităților comunitare de prelevare de probe pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁶⁾;

— A șaptea Directivă 76/372/CEE a Comisiei din 1 martie 1976 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁷⁾;

— A opta Directivă 78/633/CEE a Comisiei din 15 iunie 1978 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁸⁾;

— A noua Directivă 81/715/CEE a Comisiei din 31 iulie 1981 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁹⁾;

— A zecea Directivă 84/425/CEE a Comisiei din 25 iulie 1984 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽¹⁰⁾;

— Directiva 86/174/CEE a Comisiei din 9 aprilie 1986 de stabilire a metodei de calculare a valorii energetice a furajelor combinate pentru păsările de curte ⁽¹¹⁾;

⁽¹⁾ JO L 165, 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ JO L 155, 12.7.1971, p. 13.

⁽³⁾ JO L 279, 20.12.1971, p. 7.

⁽⁴⁾ JO L 123, 29.5.1972, p. 6.

⁽⁵⁾ JO L 83, 30.3.1973, p. 21.

⁽⁶⁾ JO L 102, 15.4.1976, p. 1.

⁽⁷⁾ JO L 102, 15.4.1976, p. 8.

⁽⁸⁾ JO L 206, 29.7.1978, p. 43.

⁽⁹⁾ JO L 257, 10.9.1981, p. 38.

⁽¹⁰⁾ JO L 238, 6.9.1984, p. 34.

⁽¹¹⁾ JO L 130, 16.5.1986, p. 53.

- A unsprezecea Directivă 93/70/CEE a Comisiei din 28 iulie 1993 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽¹⁾;
- A douăsprezecea Directivă 93/117/CE a Comisiei din 17 decembrie 1993 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ⁽²⁾;
- Directiva 98/64/CE a Comisiei din 3 septembrie 1998 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru determinarea aminoacizilor, uleiurilor și grăsimilor brute și a olaquinoxului din furaje și de modificare a Directivei 71/393/CEE ⁽³⁾;
- Directiva 1999/27/CE a Comisiei din 20 aprilie 1999 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru dozarea de amproliu, diclazuril și carbadox în furaje, de modificare a Directivelor 71/250/CEE, 73/46/CEE și de abrogare a Directivei 74/203/CEE ⁽⁴⁾;
- Directiva 1999/76/CE a Comisiei din 23 iulie 1999 de stabilire a unei metode comunitare pentru dozarea de lasalocid sodiu în furaje ⁽⁵⁾;
- Directiva 2000/45/CE a Comisiei din 6 iulie 2000 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru determinarea vitaminei A, a vitaminei E și a triptofanului din furaje ⁽⁶⁾;
- Directiva 2002/70/CE a Comisiei din 26 iulie 2002 de stabilire a cerințelor pentru determinarea nivelurilor de dioxine și de PCB de tipul dioxinelor din furaje ⁽⁷⁾;
- Directiva 2003/126/CE a Comisiei din 23 decembrie 2003 privind metoda analitică de determinare a componentelor de origine animală pentru controlul oficial al furajelor ⁽⁸⁾.

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 ar trebui abrogate.

- (4) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului permanent pentru lanțul alimentar și sănătatea animală,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Eșantionarea pentru controlul oficial al furajelor, în vederea determinării constituenților, aditivilor și a substanțelor nedorite, cu excepția reziduurilor de pesticide și a microorganismelor, se efectuează în conformitate cu metodele descrise în anexa I.

Articolul 2

Prepararea eşantioanelor 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.

Articolul 6

Directivele 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.

- (2) Din moment ce Directiva 70/373/CEE a fost înlocuită de Regulamentul (CE) nr. 882/2004, este necesară înlocuirea actelor de punere în aplicare a directivei respective cu un singur regulament. În același timp, metodele ar trebui adaptate ținând cont de progresele științifice și tehnologice în domeniu. Metodele care nu mai sunt valabile pentru scopul lor propus ar trebui eliminate. Cu toate că, pentru a se lua în considerare progresele recente în modul în care furajele sunt produse, păstrate, transportate și comercializate, se anticipează actualizarea într-un termen adecvat a dispozițiilor privind eşantionarea, în prezent este necesară menținerea dispozițiilor actuale privind eşantionarea.

- (3) Prin urmare, directivele 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE,

⁽¹⁾ JO L 234, 17.9.1993, p. 17.

⁽²⁾ JO L 329, 30.12.1993, p. 54.

⁽³⁾ JO L 257, 19.9.1998, p. 14.

⁽⁴⁾ JO L 118, 6.5.1999, p. 36.

⁽⁵⁾ JO L 207, 6.8.1999, p. 13.

⁽⁶⁾ JO L 174, 13.7.2000, p. 32.

⁽⁷⁾ JO L 209, 6.8.2002, p. 15.

⁽⁸⁾ JO L 339, 24.12.2003, p. 78.

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.

Adoptat la Bruxelles, 27 ianuarie 2009.

Pentru Comisie
Androulla VASSILIOU
Membru al Comisiei

ANEXA I

METODE DE EȘANTIONARE

1. OBIECTIV ȘI DOMENIU 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.

2. PERSONALUL CARE EFECTUEAZĂ EȘANTIONAREA

Eșantioanele se prelevează de către personal autorizat în acest sens de statele membre.

3. DEFINIȚII

Lot eșantionat: o cantitate de produs care constituie o unitate și care are caracteristici presupuse a fi uniforme.

Eșantion elementar: o cantitate prelevată dintr-un punct al lotului eșantionat.

Eșantion colectiv: o colecție de eșantioane elementare prelevate din același lot eșantionat.

Eșantion redus: o parte reprezentativă a eșantionului colectiv, obținută din acesta printr-un proces de reducere.

Eșantion final: o parte din eșantionul redus sau din eșantionul colectiv omogenizat.

4. APARATURĂ

4.1. Aparatura de prelevare de eșantioane trebuie să fie realizată din materiale care nu contaminatează produsele de eșantionat. Această aparatură poate fi omologată de către statele membre.

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.

4.2.2. *Prelevarea mecanică*

Pentru prelevarea de eșantioane din furaje în mișcare poate fi utilizată aparatură mecanică omologată.

4.2.3. *Separatorul*

Aparatura destinată divizării eșantionului în părți aproximativ egale poate fi folosită pentru prelevări de eșantioane elementare și pentru prepararea eșantioanelor reduse și finale.

5. CERINȚE CANTITATIVE

5.A.	În relație cu controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje
5.A.1.	Lotul eșantionat Mărimea lotului eșantionat trebuie să permită eșantionarea fiecărei părți constituente.

5.A.2.	Eșantioane elementare	
5.A.2.1.	Furaje vrac:	Număr minim de eșantioane elementare:
5.A.2.1.1.	loturile eșantionate nu depășesc 2,5 tone metrice	șapte
5.A.2.1.2.	loturile eșantionate depășesc 2,5 tone metrice	$\sqrt{20}$ înmulțit cu numărul de tone metrice care compune lotul eșantionat (*), până la un maximum de 40 de eșantioane elementare
5.A.2.2.	Furaje ambalate:	Numărul minim de ambalaje de eșantionat (**):
5.A.2.2.1.	Ambalaje care depășesc 1 kg:	
5.A.2.2.1.1.	loturi eșantionate reprezentând unul până la patru ambalaje	toate ambalajele
5.A.2.2.1.2.	loturi eșantionate reprezentând cinci până la 16 ambalaje	patru
5.A.2.2.1.3.	loturi eșantionate reprezentând mai mult de 16 ambalaje	$\sqrt{\text{numărul de ambalaje care compun lotul eșantionat (*)}}$, până la un maximum de 20 de ambalaje
5.A.2.2.2.	Ambalaje care nu depășesc 1 kg	patru
5.A.2.3.	Furaje lichide sau semilichide:	Numărul minim de recipiente de eșantionat (**):
5.A.2.3.1.	Recipiente care depășesc un litru:	
5.A.2.3.1.1.	loturi eșantionate de unul până la patru recipiente	toate recipientele
5.A.2.3.1.2.	loturi eșantionate de cinci până la 16 recipiente	patru
5.A.2.3.1.3.	loturi eșantionate reprezentând mai mult de 16 recipiente	$\sqrt{\text{numărul de recipiente care compune lotul eșantionat (*)}}$, până la un maximum de 20 de recipiente
5.A.2.3.2.	Recipiente care nu depășesc un litru	patru
5.A.2.4.	Blocuri de furaje și brichete minerale	Numărul minim de blocuri sau brichete de eșantionat (**): un bloc sau o brichetă per lot eșantionat de 25 de unități, până la un maximum de patru blocuri sau brichete
5.A.3.	Eșantion colectiv Se cere un singur eșantion colectiv per lot eșantionat. Cantitatea totală de eșantioane elementare care constituie eșantionul colectiv nu poate fi mai mică decât cantitățile de mai jos:	
5.A.3.1.	Furaje vrac	4 kg
5.A.3.2.	Furaje ambalate	
5.A.3.2.1.	ambalaje care depășesc 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	ambalaje care nu depășesc 1 kg	greutatea conținutului a patru ambalaje originale
5.A.3.3.	Furaje lichide sau semilichide:	
5.A.3.3.1.	recipiente care depășesc un litru:	patru litri
5.A.3.3.2.	recipiente care nu depășesc un litru	volumul conținutului a patru recipiente originale
5.A.3.4.	Blocuri de furaje sau brichete minerale:	
5.A.3.4.1.	cântărind mai mult de 1 kg fiecare	4 kg
5.A.3.4.2.	cântărind cel mult 1 kg fiecare	greutatea a patru blocuri sau brichete originale

5.A.4.	Eșantioane finale Dacă este cazul, eșantionul final provine din eșantionul colectiv, prin reducere. Se cere 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
5.B.	În funcție de controlul substanțelor sau produselor nedorite care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje, cum ar fi aflatoxinele, cornul-secarei, ricinul și crotalaria din materiile prime furajere (***)	
5.B.1.	Lot eșantionat: a se vedea 5.A.1.	
5.B.2.	Eșantioane elementare	
5.B.2.1.	Furaje vrac: a se vedea 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Furaje ambalate:	Numărul minim de ambalaje de eșantionat:
5.B.2.2.1.	loturi eșantionate numărând unul până la patru ambalaje	toate ambalajele
5.B.2.2.2.	loturi eșantionate de cinci până la 16 ambalaje	patru
5.B.2.2.3.	loturi eșantionate numărând mai mult de 16 ambalaje	$\sqrt{\text{numărul de ambalaje care compun lotul eșantionat (*)}}$, până la un maximum de 40 de ambalaje
5.B.3.	Eșantioane colective Numărul de eșantioane colective va varia în funcție de mărimea lotului eșantionat. Numărul minim de eșantioane colective per lot eșantionat este redat mai jos. Greutatea totală a eșantioanelor elementare care constituie eșantionul colectiv nu poate fi mai mică de 4 kg	
5.B.3.1.	Furaje vrac	
	Greutatea lotului eșantionat în tone metrice:	Numărul minim de eșantioane colective per lot eșantionat:
	până la 1	1
	mai mult de 1 și până la 10	2
	mai mult de 10 și până la 40	3
	mai mult de 40	4
5.B.3.2.	Furaje ambalate	
	Mărimea loturilor eșantionate pentru furajele ambalate, în număr de ambalaje:	Numărul minim de eșantioane colective per lot eșantionat:
	1 până la 16	1
	17 până la 200	2
	201 până la 800	3
	mai mult de 800	4
5.B.4.	Eșantioane finale Eșantionul final provine din fiecare eșantion colectiv, prin reducere. Se cere analiza a cel puțin un eșantion final <i>per eșantion colectiv</i> . Greutatea eșantionului final de analizat nu poate fi mai mică de 500 g.	

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

(**) În cazul ambalajelor sau recipientelor care nu depășesc 1 kg sau un litru și în cazul blocurilor sau brichetelor de sare care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unui ambalaj sau recipient original, un bloc sau o brichetă de sare.

(***) Metodele menționate în 5.A sunt destinate a fi utilizate în controlul aflatoxinelor, cornului-secarei, ricinului și crotalarii din furajele complete și complementare.

6. INSTRUCȚIUNI PENTRU PRELEVAREA, PREPARAREA ȘI AMBALAREA EȘANTIOANELOR

6.1. Aspecte generale

Eșantioanele se prelevează și se prepară cât mai rapid posibil, luând în considerare precauțiile necesare pentru a asigura că produsul nu este nici modificat, nici contaminat. Instrumentele, suprafețele de lucru și recipientele destinate eșantionării trebuie să fie curate și uscate.

6.2. Eșantioane elementare

6.2.A. În relație cu controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje

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

6.2.A.1. Furaje vrac

Lotul eșantionat se împarte în mod imaginar în mai multe părți aproximativ egale. În mod aleator, se selectează un număr de părți corespunzător numărului de eșantioane elementare necesare, în conformitate cu punctul 5.A.2, și se prelevează cel puțin un eșantion din fiecare din aceste părți.

Dacă este cazul, eșantionarea poate fi efectuată atunci când lotul este în mișcare (încărcare sau descărcare).

6.2.A.2. Furaje ambalate

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de ambalaje, conform indicațiilor de la punctul 5.A.2, o parte a conținutului fiecărui ambalaj se scoate folosind o sondă sau o lopată. Dacă este cazul, eșantioanele se prelevează după ce ambalajele au fost golite separat. Orice aglomerări se destramă, dacă este cazul prin separarea lor de eșantion, urmată de reincorporare în eșantion, pentru fiecare eșantion colectiv în parte.

6.2.A.3. Furaje lichide sau semilichide, omogene sau omogenizabile

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de recipiente, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.A.2, conținutul lor se omogenizează, dacă este necesar, și se prelevează o cantitate din fiecare recipient.

Eșantioanele elementare pot fi prelevate la descărcarea conținutului.

6.2.A.4. Furaje lichide sau semilichide, neomogenizabile

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de containere, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.A.2, eșantioanele se prelevează 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.

6.2.A.5. Blocuri de furaje și brichete minerale

După selectarea pentru eșantionare a numărului necesar de blocuri sau brichete, conform indicațiilor de la punctul 5.A.2, se prelevează o parte din fiecare bloc sau brichetă.

6.2.B. În relație cu controlul substanțelor sau al produselor nedorite care ar putea fi distribuite neuniform în masa de furaje, cum ar fi aflatoxinele, cornul-secarei, ricinul și crotalaria din materiile prime furajere

Lotul eșantionat se împarte în mod imaginar în mai multe părți aproximativ egale, corespunzătoare numărului de eșantioane colective prevăzute la punctul 5.B.3. Dacă acest număr este mai mare decât 1, numărul total de eșantioane elementare prevăzute la punctul 5.B.2 se distribuie aproximativ egal între diferitele părți. În continuare se prelevează eșantioane cu mărimi aproximativ egale⁽¹⁾, astfel încât cantitatea totală a eșantioanelor provenite din fiecare parte să nu fie mai mică decât cantitatea minimă de 4 kg necesară pentru fiecare eșantion colectiv. Eșantioanele elementare prelevate din diferite părți nu se consideră colective.

⁽¹⁾ Pentru furajele ambalate, o parte a conținutului ambalajelor de eșantionat se prelevează prin utilizarea unei sonde sau a unei lopeți, după golirea separată a ambalajelor, dacă este cazul.

6.3. Prepararea eşantioanelor colective**6.3.A. În relație cu controlul substanțelor produselor cu distribuție uniformă în masa de furaje**

Eşantioanele elementare se amestecă pentru a forma un singur eşantion colectiv.

6.3.B. În relație cu controlul substanțelor sau produselor nedorite care ar putea fi distribuite neuniform în masa de furaje, cum ar fi aflatoxinele, cornul-secarei, ricinul și crotalaria din materii prime furajere

Eşantioanele elementare prelevate din fiecare parte a lotului eşantionat se amestecă și se constituie numărul de eşantioane colective prevăzute la punctul 5.B.3, avându-se grijă să se noteze proveniența fiecărui eşantion colectiv.

6.4. Prepararea eşantioanelor finale

Materialul din fiecare eşantion colectiv se amestecă cu grijă pentru a se obține un eşantion omogenizat ⁽¹⁾. Dacă este necesar, eşantionul colectiv se reduce mai întâi la cel puțin 2 kg sau doi litri (eşantion redus), fie prin utilizarea unui separator mecanic sau automat, fie prin metoda sferturilor.

Se prepară apoi cel puțin trei eşantioane finale având aproximativ aceeași cantitate, în conformitate cu cerințele cantitative prevăzute la punctul 5.A.4 sau 5.B.4. Fiecare eşantion se pune într-un recipient corespunzător. Se iau toate precauțiile necesare pentru evitarea oricărei modificări de compoziție a eşantionului, a contaminării sau a falsificării, care ar putea avea loc în timpul transportării sau depozitării.

6.5. Ambalarea eşantioanelor finale

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

7. PROCESUL-VERBAL DE EȘANTIONARE

Pentru fiecare eşantionare se întocmește un proces-verbal, care permite identificarea fără ambiguități a lotului eşantionat.

8. DESTINAȚIA EȘANTIOANELOR

Pentru fiecare eşantion colectiv se trimite, cât mai repede posibil, către laboratorul de analize autorizat, cel puțin un eşantion final, împreună cu informațiile necesare specialistului.

⁽¹⁾ Orice aglomerări se destramă (dacă este cazul prin separarea lor de eşantion urmată de reincorporarea lor în eşantion), pentru fiecare eşantion colectiv în parte.

ANEXA II

DISPOZIȚII GENERALE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ A FURAJELOR**A. PREPARAREA EȘANTIOANELOR ÎN VEDEREA ANALIZĂRII****1. Obiectiv**

Procedurile descrise mai jos privesc prepararea pentru analizarea eșantioanelor finale, trimise laboratoarelor de control după eșantionare conform dispozițiilor menționate în anexa I.

Prepararea acestor eșantioane trebuie astfel efectuată încât cantitățile prelevate, în conformitate cu dispozițiile din metoda de analiză, să fie omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

2. Precauțiile ce trebuie luate

Procedura de preparare a eșantioanelor care trebuie urmată este dependentă de metodele de analiză utilizate. De aceea, este de importanță majoră a se asigura ca procedura de preparare a eșantioanelor urmată să fie adecvată metodei de analiză utilizate.

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

Măcinarea, amestecarea și cernerea se efectuează cât mai repede posibil 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. De asemenea, aparatul folosit nu trebuie să constituie o sursă de contaminare cu oligoelemente.

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

3. Procedura

Se divide eșantionul în subeșantioane adecvate, în vederea analizării și trimerii, prin utilizarea unor tehnici adecvate de separare, cum ar fi eșantionarea alternativă cu ajutorul lopeții sau eșantionarea în condiții staționare sau rotative. Formarea unui con și selectarea de sferturi nu este recomandată deoarece ar putea să se formeze subeșantioane care să dea naștere la erori de separare mari. Eșantionul de trimis se păstrează într-un recipient adecvat, curat și uscat, prevăzut cu un capac ermetic, iar subeșantioanele de analizat, cu greutate de cel puțin 100 g, se prepară în modul indicat mai jos.

3.1. Furaje care pot fi măcinate ca atare

Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, se cerne întregul eșantion printr-o sită cu orificii pătrate cu latura de 1 mm (în conformitate cu recomandarea ISO R565), după măcinare, dacă este cazul. Se evită măcinarea exagerată.

Se amestecă eșantionul trecut prin sită și se pune într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă din nou, imediat înainte de a preleva eșantionul pentru analiză.

3.2. Furaje care pot fi măcinate după uscarea

Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, eșantionul 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. În continuare, se procedează astfel cum se indică în secțiunea 3.1.

3.3. Furaje lichide sau semilichide

Eșantioanele se recoltează într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă minuțios, imediat înainte de prelevarea eșantionului de analizat.

3.4. Alte furaje

Eșantioanele care nu pot fi preparate conform unei proceduri indicate anterior se tratează prin orice altă procedură prin care se asigură că eșantioanele prelevate în vederea analizării sunt omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

4. Depozitarea eşantioanelor

Eşantioanele trebuie păstrate la o temperatură care să nu le altereze compoziția. Eşantioanele destinate analizării prezenței vitaminelor sau substanțelor foarte sensibile la lumină se păstrează în recipiente de sticlă brună.

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.

C. APLICAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI EXPRIMAREA 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. Raportarea metodei de analiză utilizate

În general, pentru determinarea fiecărei substanțe în furaje se stabilește o singură metodă de analiză. În cazul în care sunt indicate mai multe metode, în buletinul de analiză se specifică metoda aplicată de laboratorul de control.

4. Numărul determinărilor

Rezultatul menționat în buletinul de analiză reprezintă valoarea medie obținută în urma a cel puțin două determinări, efectuate pe porțiuni distincte ale eşantionului, cu repetabilitate satisfăcătoare.

Totuși, 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 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 unele cazuri, intervalul de variație acceptabil respectiv este definit în legislație, de exemplu în Directiva 79/373/CEE a Consiliului (¹).

5. Raportarea rezultatului analitic

Rezultatul analitic se exprimă în maniera indicată în metoda de analiză, printr-un număr adecvat de cifre semnificative și se ajustează, dacă este cazul, la conținutul de umiditate al eşantionului final înainte de preparare.

(¹) JO L 86, 6.4.1979, p. 30.

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, inclusiv dioxina și PCB asemănători dioxinei, un produs destinat utilizării în furaje se consideră neconform în ce privește conținutul maxim acceptat dacă rezultatul analitic este considerat că depășește conținutul maxim, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă și 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 +/- 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 MATERILOR 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 greutatei 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/cm².
- 3.4. Cuptor izoterm cu încălzire electrică (± 2 °C), ventilat corespunzător și care asigură o reglare rapidă a temperaturii ⁽¹⁾.
- 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.

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 eşantion. 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 eşantion. 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.

⁽¹⁾ Pentru uscarea cerealelor, a făinii fine, a tărâțelor 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 %.

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 prelungește 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 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;

m₀ = 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;

m₁ = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după uscare prealabilă;

m₂ = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după zdrobire sau măcinare;

m₀ = greutatea, în grame, a eșantionului de testat uscat.

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 greutății 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 greutății 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:

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

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 cărei 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, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 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) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată.
- 3.13. Acetanilidă (m.p. = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, conținutul în N = 10,36 %).
- 3.14. Zaharoză (fără azot).
- 3.15. Acid boric (H_3BO_3).
- 3.16. Soluție indicator de roșu de metil: se dizolvă 100 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol sau metanol.
- 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 sulfaziilor. 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).

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).

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:

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

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.

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 (ρ_{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, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ 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. 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 (± 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.

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 determinarea 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 NH₃.
- 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 filtru cutat.

Cu ajutorul unei pipete se introduce 1 ml de soluție de acid boric (3.3) în partea centrală a celulei Conway și 1 ml de filtrat de eșantion în coroana celulei. 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.

6. Calculul rezultatelor

1 ml de H₂SO₄ 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:

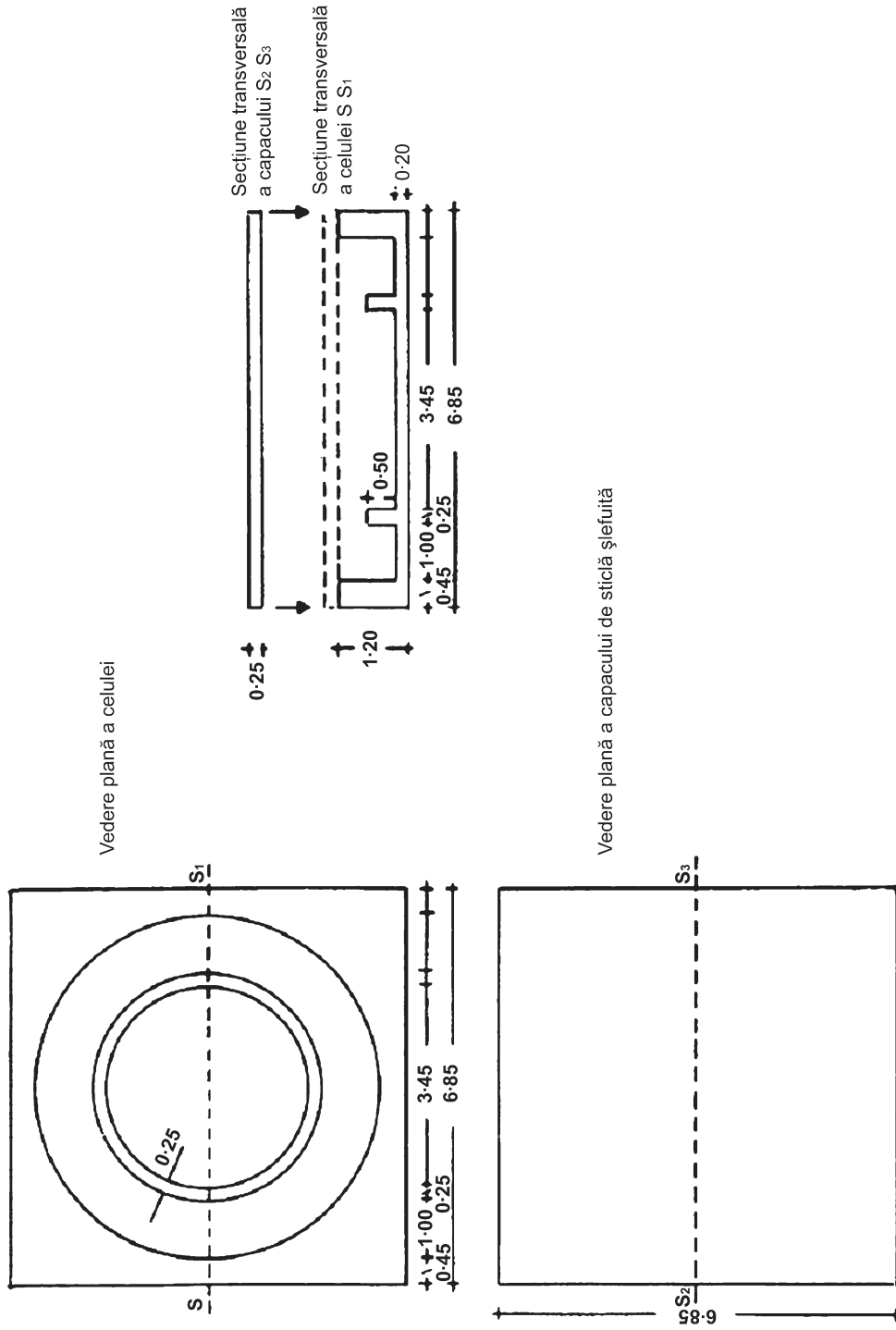
- 10 %, în valoare relativă, pentru un conținut în amoniac mai mic de 1 %;
- 0,1 %, în valoare absolută, pentru un conținut în amoniac de 1 % sau mai mare.

7. Observație

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

CELULA CONWAY

Scara 1/1



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 eşantion 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 eşantion.

6. Calculul rezultatelor

1 ml de H₂SO₄ 0,05 mol/litru corespunde la 1,7 mg de amoniac.

Se exprimă rezultatul ca procent din eşantion.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eşantion 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 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.
- 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 cisteic.
- 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 % tioglicol: se iau 8,2 ml de HCl (3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml de apă, se adaugă 20 ml de tioglicol (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 tioglicol (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.
- 3.27.1. Soluție etalon stoc de aminoacizi (3.16.1).
 $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ pentru fiecare, în acid clorhidric.
Se pot obține din surse comerciale.
- 3.27.2. Soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
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 cistic 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 cistic 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 căptușeală 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 $\pm 2^\circ\text{C}$.
- 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.
- 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 $c = 0,8 \text{ mol/l}$ 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
- 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 mărgelă 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.

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.

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.

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.

Coeficient 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

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Premixuri	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = număr de laboratoare participante.

7.2 Reproducibilitate

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.

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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ pentru a se evita formarea de BaCO_3 , 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_{20} 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, de calitate HPLC.
- 3.9. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.
- 3.10. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 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 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 α -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 (α -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 etanolamnei (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 μm sau echivalent.
- 4.3. pH-metru.
- 4.4. Vas de polipropilenă, cu capacitate de 125 ml, cu gât larg și dop filetat.
- 4.5. Filtru cu membrană, 0,45 μm .
- 4.6. Autoclavă, 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar.
- 4.7. Agitator mecanic sau amestecător magnetic.
- 4.8. Mixer Vortex.

5. **Procedură**5.1. *Prepararea eșantioanelor*

Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, 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 (3.9).

5.2. *Determinarea triptofanului liber (extract)*

Se cântărește cu o abatere de 1 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (5.1) într-un flacon tip Erlenmeyer. Se adaugă 100 ml de acid clorhidric (3.13) și 5 ml din soluția 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 și se pipetează 10 ml din soluția 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 obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ același volum ca și soluția etalon de calibrare (3.17)).

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 de HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

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

5.3. *Determinarea triptofanului total (hidrolizat)*

Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g din eșantionul preparat (5.1) într-un vas de polipropilenă (4.4). Porția de eșantion cântărit are un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă 8,4 g de hidroxid de bariu octahidrat (3.4) și 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 pereții vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul filetat și se închide vasul neermetic. Se transferă într-o autoclavă (4.6) cu apă clocotită și se expun la vapori de apă timp de 30-60 minute. Se închide autoclava și 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)₂·8H₂O, se adaugă la amestecul cald 30 ml apă la temperatura camerei. Se agită sau se amestecă ușor. Se adaugă 2 ml din soluția concentrată de etalon intern (α-metil-triptofan) (3.16). Se răcesc vasele într-o baie de apă/gheață timp de 15 minute.

Apoi, se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (3.14). Se menține vasul în baie de răcire și 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 obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la volumul definit necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu provoacă precipitare.

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 ₁₈ , 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 injectare	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);

V₁ = 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);

V₂ = 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);

V₃ = 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.

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 eşantioane de către 13 laboratoare pentru a certifica metoda de extracție a triptofanului liber. Fiecare eşantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul următor:

	Eşantion 4 Amestec de grâu cu soia	Eşantion 5 Amestec de grâu cu soia (= eşantion 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, %.

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

	Eşantion 1 Furaje mixte pentru porci (CRM 117)	Eşantion 2 Făină de pește cu conținut mic de gră- simi (CRM 118)	Eşantion 3 Făină din soia (CRM 119)	Eşantion 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 α -metil-triptofan.

Eluție izocratică urmată de curățarea coloanei prin gradient:

Coloană pentru cromatografie lichidă:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 μm sau echivalent		
Temperatura coloanei:	32 °C		
Faza mobilă:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /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 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**

Prezența metodei este destinată determinării în furaje a conținutului de uleiuri și grăsimi brute. Ea nu este aplicabilă analizei 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.

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⁽¹⁾.

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.

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

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 ± 3 °C.

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 impropriei 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 solventul prin distilare, se usucă și se procedează astfel cum se indică la ultimul paragraf al punctului 5.1.

Se elimină solventul 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.
- 8.6. Preextracția prin procedura A înainte de hidroliză și de reextracție 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/grăsimilor 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).

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 ± 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 ± 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 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $475\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 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 limpește cu soluții 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.
- 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_2CO_3 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, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, lipsită de fier, în 100 ml de apă.

- 3.8.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 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. Reziduul 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 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 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 (3.12) 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 limpește 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 limpește 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.
- 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/litru, două minute încălzire, zece minute fierbere

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Lactoză $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoză $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 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

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, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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. 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, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, lipsită de fier, în 100 ml apă.
- 3.4.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 de g de acid citric, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 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 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 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/litru, două minute încălzire, zece minute fierbere

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Lactoză $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoză $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 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

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 ⁽¹⁾.

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.

⁽¹⁾ JO L 125, 23.5.1996, p. 35.

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 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 limpezește 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*

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

P = rotația optică totală în grade unghiulare;

- P' = rotația optică în grade unghiulare a substanțelor solubile în etanol 40 % (V/V);
- $[\alpha]_D^{20}$ = 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

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

- 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.

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 roșiatice, 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.

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 cântăresc 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 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 reziduul 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 rezidului 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 răsucește 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 răsucește 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).

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 CO₂ eliberat de porția de eșantion;

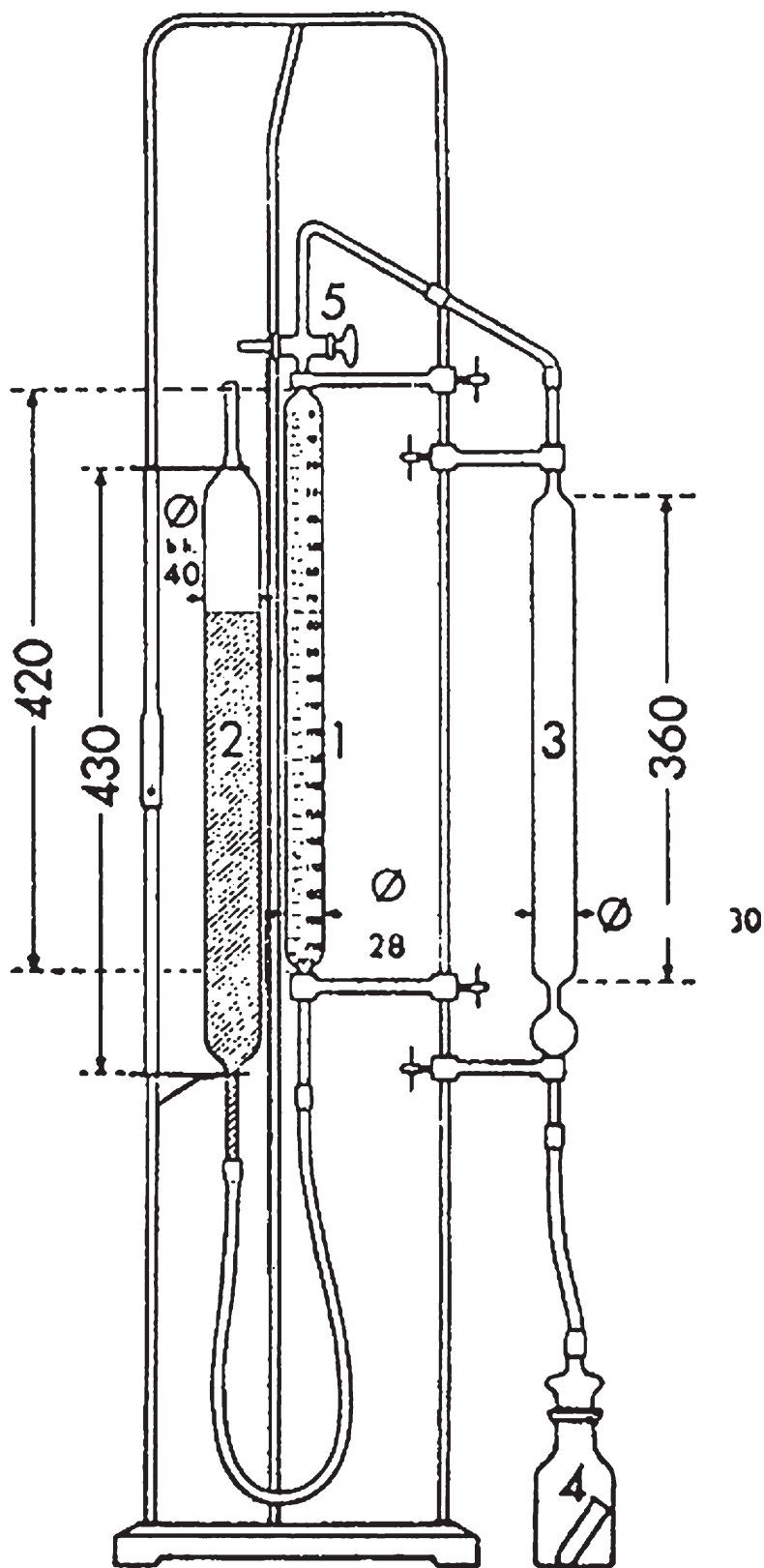
V₁ = ml de CO₂ eliberat de 0,5 g de CaCO₃;

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 CO₂

(Dimensiuni în mm)

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 NH_4VO_3 în 400 ml de apă fierbinte. Amestecând constant, se adaugă lent 20 ml de acid azotic diluat [7 ml de HNO_3 (3.4) + 13 ml de H_2O] 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 KH_2PO_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 ușor, se lasă să se răcească ușor, se mai adaugă puțin acid azotic (3.4) și se readuce 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 efervescența 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 rezidul 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 %.

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. Principii

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.

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. Titrarea

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. Titrarea 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*-vitamină 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 fenoltaleină, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 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 $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$
- 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 $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$
- 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.

3.1.3. 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. Pălpii 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, C₁₈, 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.

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 (3.1.3), 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 fenolfaleină (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 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 reziduuul 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_{18} (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 μ l) 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 aceiași 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 croma- 250 mm \times 4 mm, C_{18} , particule de 5 sau 10 μ m sau echivalent
tografie lichidă (4.5.1):

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 μ l 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).

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 gradație 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:

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

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

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.

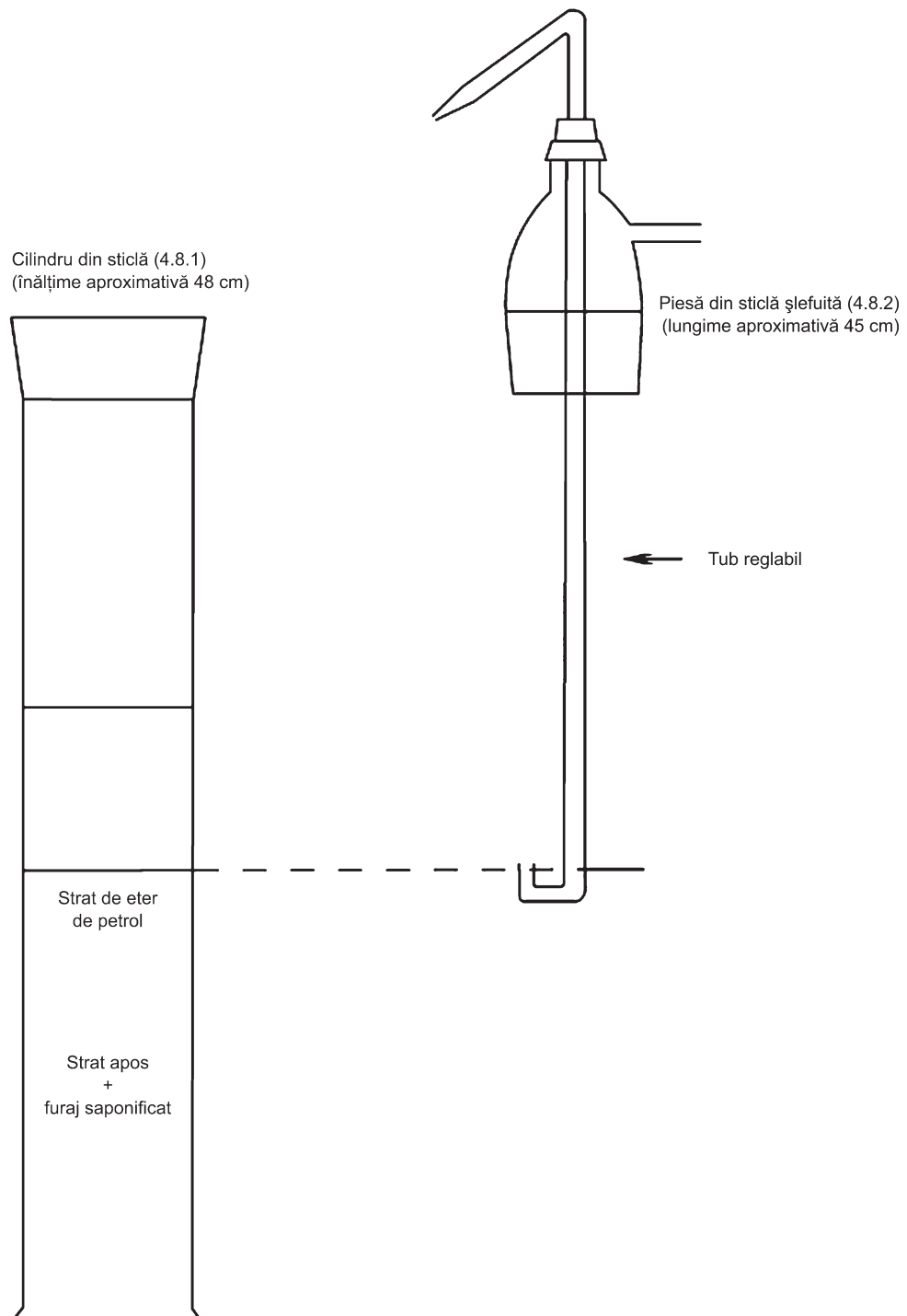
9. **Rezultatele unui studiu colaborativ** ⁽¹⁾

	Premix	Furaje tip premix	Concentrate minerale	Furaje proteice	Furaje pentru porci
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.

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

Figura 1
Aparat de extracție (4.8)



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- α -tocoferol acetat per kg. 1 mg DL- α -tocoferol acetat corespunde la 0,91 mg DL- α -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 vitamină 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, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 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 fenoltaleină, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ 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- α -tocoferol acetat, extra pur, cu activitate certificată
- 3.10.1. Soluție stoc de DL- α -tocoferol acetat: se cântăresc 100 mg de DL- α -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- α -tocoferol acetat. (pentru control UV vezi 5.6.1.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4).
- 3.11. DL- α -tocoferol, extra pur, cu activitate certificată
- 3.11.1. Soluția stoc de DL- α -tocoferol: se cântăresc 100 mg de DL- α -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- α -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.
- 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, C₁₈, 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.

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 fenoltaleină (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- α -tocoferol trebuie să fie de ordinul a 5-30 μ g/ml).

5.5. Determinarea prin HPLC

Vitamina E se separă pe o coloană C₁₈ 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).

Se injectează o parte alicotă (de exemplu 20 μ l) 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 injecții ale aceleiași soluții eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injecții 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 croma- 250 mm \times 4 mm, C₁₈, particule de 5 sau 10 μ m sau echivalent
tografie lichidă (4.5.1):

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 -tocoferol sau DL- α -tocoferol)

5.6.1. Etalon de acetat de DL- α -tocoferol

5.6.1.1. Prepararea soluției etalon de lucru

Se picură din pipetă 25 ml din soluția stoc de acetat de DL- α -tocoferol (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 μ g DL- α -tocoferol per ml, echivalent cu 50 μ g acetat de DL- α -tocoferol 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 -tocoferol, echivalent cu 2,28, 4,55, 9,1 μg/ml și 22,8 μg/ml DL- α -tocoferol.

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 -tocoferol (3.10.1)*

Se diluează 5 ml din soluția stoc de acetat de DL- α -tocoferol (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.

5.6.2. Etalonul de DL- α -tocoferol

5.6.2.1. *Prepararea soluției etalon de lucru*

Se pun cu pipeta 2 ml din soluția stoc de DL- α -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 μg DL- α -tocoferol per ml, echivalent cu 44 μg acetat DL- α -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 μg/ml DL- α -tocoferol, echivalent cu 2,2, 4,4, 8,79 μg/ml și 22 μg/ml acetat de DL- α -tocoferol.

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.

5.6.2.3. *Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol (3.11.1)*

Se diluează 2 ml din soluția stoc de DL- α -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 μg/ml (calculată ca acetat de α -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 mg/kg, este dat de următoarea formulă:

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

unde:

c = concentrația de vitamina E (ca acetat de α -tocoferol) al soluției de eșantion (5.4) în μg/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.
- 7.4. Odată efectuată măsurătoarea spectrofotometrică a soluției de acetat de DL- α -tocoferol sau de DL- α -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 α , β , γ și δ .
- 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 ⁽¹⁾

	Premix	Furaje cu pre-mix	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;

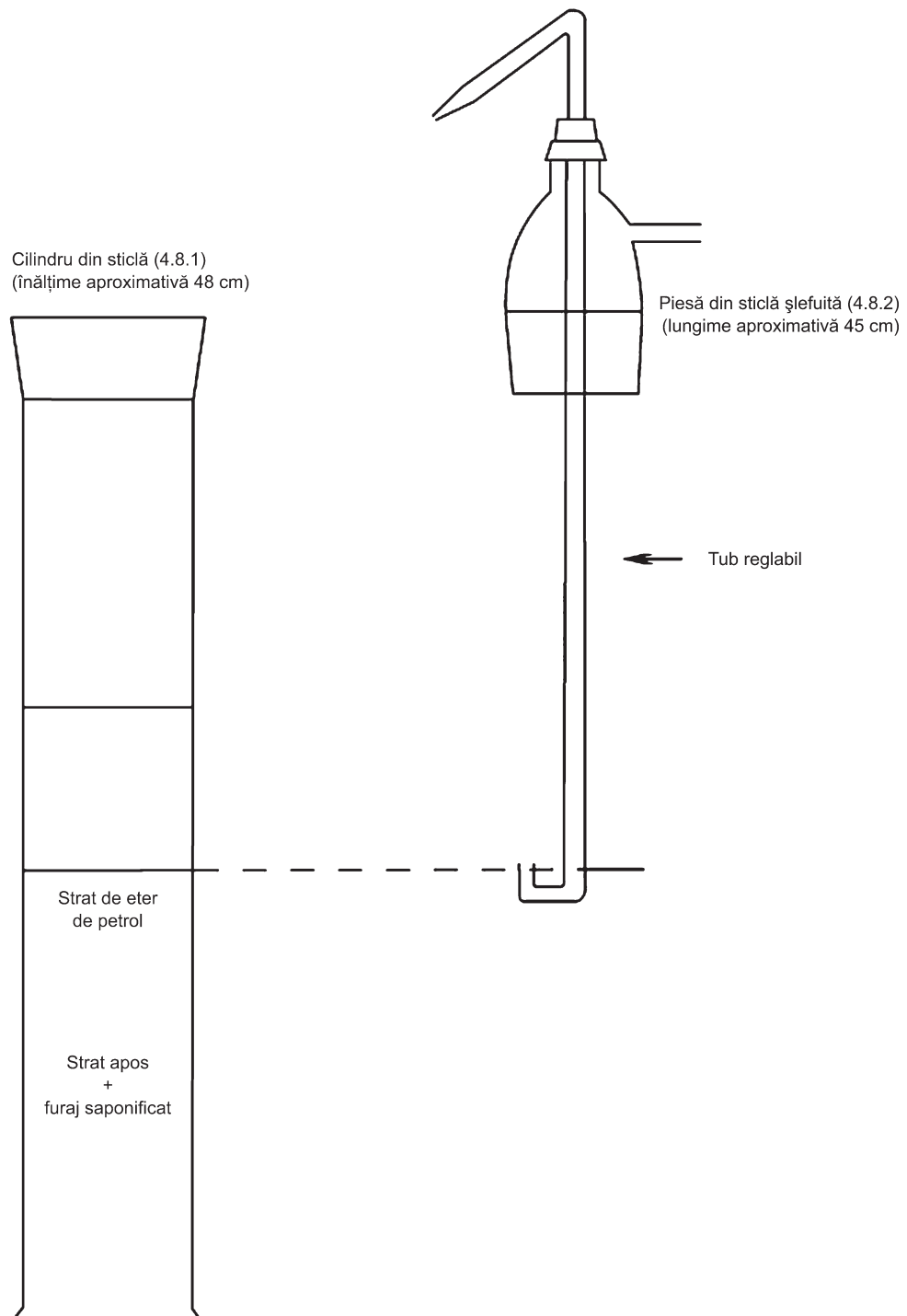
R = reproductibilitate;

CV_r = coeficientul de variație a repetabilității;

CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității.

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

Figura 1
Aparat de extracție (4.8)



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.
- 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 ⁽¹⁾

5.1. Eșantioane care conțin materie organică

5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză ⁽²⁾

- 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)].

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 CO₂). 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.

⁽¹⁾ 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).

⁽²⁾ 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 evaporează 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.

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.

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

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.
- 3.6. Substanța etalon halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-clor-3-[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 (ρ_{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.
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 \times 4 mm, C_{18} , particule de 10 μm sau o coloană echivalentă.
- 4.5. Coloană de sticlă (300 mm \times 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).

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, îndepărțând 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 undei 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 timpi 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.

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 μg/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 (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 μg/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 μg/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 ± 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.

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 ⁽¹⁾ 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 _R (mg/kg)	—	0,45	0,43	0,4	0,42
CV _R (%)	—	16	18	14	17
Rec. (%)		86	74	88	75

ND = nedetectat;

S_R = deviația standard a reproductibilității;

CV_R = 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.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, p. 1 252-1 256.

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.

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 μm (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 µg/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 µg/ml de robenidină. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

3.10. Apă de calitate HPLC.

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, C₁₈, 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.

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 reziduul 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 timpi de retenție constanți.

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.

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:

- 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;
- 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 absorbția 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 absorbția analitului etalon;
- 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 absorbția relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbția 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:

	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-2yl)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 C₁₈ 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 μ 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 ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.8.2. Soluția etalon de diclazuril, 50 μ g/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 ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.9. Substanță etalon internă: 2,6 diclor- α -(4-clorfenil)-4-[4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazină-2 (3H)-il] α -metilbenzen-acetonitril

3.9.1. Soluție etalon stoc internă de diclazuril, 500 μ g/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 ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.9.2. Soluție etalon internă, 50 μ g/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 ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.9.3. Soluție etalon internă pentru premixuri, p/1 000 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 ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de o lună.

3.10. Soluție de calibrare, 2 μ g/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 C₁₈ 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).

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 μ m, 100 mm \times 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 μ m.

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 eșantionul, 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 eșantion. 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 îmbogăţeşte adăugând o cantitate de diclazuril similară celei deja prezente în eşantion. Acest eşantion este analizat împreună cu eşantionul neîmbogăţit, iar recuperarea poate fi calculată prin scădere.

5.2. Extracţie

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 soluţia etalon internă (3.9.2), 200 ml din solventul de extracţie (3.12) şi se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (4.1) pe parcursul nopţii. 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 şi se diluează în 20 ml apă. Se transferă această soluţie într-un cartuş de extracţie (3.11) şi se trece prin acesta prin aplicare de vid (4.5). Se spală cartuşul cu 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracţie (3.12) şi apă, 65 + 35 (V + V). Se elimină fracţiunile colectate şi se eluează compuşi cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracţie (3.12) şi apă, 80 + 20 (V + V). Se evaporă această fracţiune 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) şi 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 soluţia etalon internă (3.9.3) şi 200 ml din solventul de extracţie (3.12) şi se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (4.1) pe parcursul nopţii. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000/p ml (p = conţinutul 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 şi la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator rotativ (4.3). Se dizolvă din nou rezidul în 10 ml de DMF (3.6), se adaugă 15 ml de apă (3.1) şi se amestecă. Se continuă cu determinarea prin HPLC (5.3).

5.3. Determinarea prin HPLC

5.3.1. Parametri

Următoarele condiţii sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica şi alte condiţii, 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):	Soluţie apoasă de acetat de amoniu şi sulfat acid de tetrabutilamoniu
	Eluent B (3.13.2):	acetonitril
	Eluent C (3.13.3):	metanol
Mod de eluţie:	— gradient linear	
	— condiţii iniţiale: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)	
	— după 10 min, eluţia prin gradient timp de 30 min la: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).	
	Se clăteşte cu B timp de 10 minute.	
Debit:	1,5-2 ml/minut	
Volum de injecţie:	20 µl	
Lungimea de undă a detectorului:	280 nm	

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluţia de calibrare (3.10) care conţine 2 µg/ml, până când se obţin valori de vârf şi timpi de retenţie constanţi.

5.3.2. Soluţia de calibrare

Se injectează 20 µl din soluţia de calibrare (3.10) de mai multe ori şi se determină înălţimea (aria) medie a vârfurilor de diclazuril şi a vârfurilor etalonului intern.

5.3.3. Soluţia de eşantion

Se injectează 20 µl din soluţia de eşantion (5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori şi se determină înălţimea (aria) medie a vârfului de diclazuril şi a vârfurilor etalonului intern.

6. Calculul rezultatelor

6.1. Furaje

Conținutul în diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 \times V}{m} [\text{mg/kg}]$$

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 mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

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 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 ± 2 nm;
- (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 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 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 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 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;

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, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de *Streptomyces lasaliensis*), E 763

3.10.1. Soluție etalon stoc de lasalocid sodic, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

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.

3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid sodic, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

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 C₁₈, 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. Furaje

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 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 ₁₈ , 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.

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 μg/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 μg/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 %.

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 pen- tru pui	Eșantion 2 Premix pen- tru curcani	Eșantion 3 Pelete pentru curcani	Eșantion 4 Sfărâmături pentru pui	Eșantion 5 Hrană pentru curcani	Eșantion 6 Hrană A pen- tru pui	Eșantion 7 Hrană B pen- tru 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_r (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4	5,37
S_R (mg/kg)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R (%)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,7
Conținut nomi- nal (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_r = deviație standard a repetabilității;
 S_R = deviație standard a reproductibilității;
 CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, %;
 CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %.

ANEXA V

METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL SUBSTANȚELOR NEDORITE DIN FURAJE**A. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE GOSIPOL LIBER ȘI TOTAL****1. 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.
- 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 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:

$$\text{Gosipolul liber} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gosipolul total} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Conținutul de gosipol liber sau de gosipol total al eșantionului este calculat folosind următoarea formulă:

$$\% \text{ gosipol} : \frac{E \times 1\ 250}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times p \times a}$$

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).

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 μg).

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 μg).

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.

B. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI AL NIVELURILOR DE DIFENILI POLICLORURAȚI (PCB) ASEMĂNĂTORI DIOXINEI

I. METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE INTERPRETARE A REZULTATELOR ANALITICE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Eșantioanele destinate controalelor oficiale ale nivelurilor de dioxine [dibenzo-p-dioxine policlorurate (PCDD) și dibenzofurani policlorurați (PCDF)] și de difenili policlorurați (PCB) ⁽¹⁾ asemănători dioxinei din furaje se prelevează în conformitate cu dispozițiile din anexa I. Este necesar să se aplice cerințele cantitative referitoare la controlul substanțelor sau produselor uniform repartizate în furaje, în conformitate cu dispozițiile de la punctul 5.A din anexa I. Eșantioanele colective astfel obținute se consideră ca reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Respectarea conținuturilor maxime stabilite în Directiva 2002/32/CE a Parlamentului European și a Consiliului ⁽²⁾ se stabilește pe baza conținuturilor determinate în eșantioanele de laborator.

2. Conformitatea lotului sau sublotului cu specificațiile

Lotul este acceptat dacă rezultatul analitic al unei analize unice nu depășește conținutul maxim stabilit în Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare.

Lotul nu se conformează conținutului maxim stabilit în Directiva 2002/32/CE dacă rezultatul analitic pentru limita superioară ⁽³⁾, confirmat de o analiză paralelă ⁽⁴⁾, depășește, cu un grad de certitudine rezonabil, conținutul maxim, ținând seama de incertitudinea măsurării.

⁽¹⁾ Tabelul factorilor de echivalență toxică, TEF (= toxic equivalency factors), pentru dioxine, furani și compuși PCB asemănători dioxinei

Congener	Valoare TEF	Congener	Valoare TEF
Dibenzo-p-dioxine („PCDD”)		Compuși PCB „asemănători dioxinei”:	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001	Mono-orto PCB	
		PCB 105	0,0001
Dibenzofurani („PCDF”)		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Abrevieri utilizate: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octa; CDD = clordibenzo-p-dioxină; CDF = clordibenzofuran; CB = difenili clorurați.

⁽²⁾ JO L 140, 30.5.2002, p. 10.

⁽³⁾ Conceptul de „limită superioară” necesită utilizarea limitei de cuantificare pentru participarea la TEQ a fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „limită inferioară” necesită utilizarea valorii zero pentru participarea la TEQ a fiecărui congener necuantificat. Conceptul de „limită medie” necesită utilizarea jumătății limitei de cuantificare, calculându-se participarea la TEQ a fiecărui congener necuantificat.

⁽⁴⁾ Analiza paralelă este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încărcării accidentale a eșantioanelor. Prima analiză, care ține cont de incertitudinea de măsurare, se utilizează pentru verificarea conformității. Dacă analiza se efectuează în contextul unui incident de contaminare cu dioxină, se poate omite confirmarea de către o analiză paralelă atunci când eșantioanele selecționate pentru analiză sunt asociate, prin intermediul trasabilității, cu incidentul de contaminare cu dioxină.

Incertitudinea măsurării poate fi luată în considerare în una din următoarele două modalități:

- calculându-se incertitudinea extinsă cu ajutorul unui coeficient de acoperire 2 care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot nu este conform dacă valoarea măsurată minus U este mai mare de nivelul maxim. În cazul unei determinări separate a dioxinelor și a PCB-urilor asemănători dioxinei, suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale dioxinelor și a PCB-urilor asemănători dioxinei se utilizează pentru suma dioxinelor și a PCB-urilor asemănători dioxinei;
- stabilindu-se limita de decizie ($CC\alpha$) în conformitate cu dispozițiile Deciziei 2002/657/CE a Comisiei ⁽¹⁾ (punctul 3.1.2.5 din anexă – cazul unor substanțe pentru care este stabilită o limită autorizată). Un lot este neconform dacă valoarea măsurată este egală sau mai mare decât $CC\alpha$.

Prezentele norme de interpretare se aplică pentru rezultatele analitice obținute pentru eșantioanele destinate controlului oficial. Ele nu aduc atingere dreptului statelor membre de a aplica analizelor normele de drept intern în scop de apărare sau de arbitraj.

II. PREGĂTIREA EȘANTIOANELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB ASEMĂNĂTORI DIOXINELOR

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Prezentele cerințe se aplică atunci când furajele și materiile prime furajere sunt analizate pentru a se determina dioxinele [dibenzo-p-dioxine policlorurate (PCDD), dibenzofuranii policlorurați (PCDF)] și difenilii policlorurați asemănători dioxinelor (PCB).

Monitorizarea prezenței dioxinelor în furaje se poate realiza printr-o strategie care implică o metodă de depistare, cu scopul de a selecta acele eșantioane cu niveluri de dioxine și de PCB asemănători dioxinei care au valori cu mai puțin de 25 % inferioare sau superioare concentrației de interes. Concentrația de dioxine din acele eșantioane în care se identifică niveluri semnificative trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.

Metodele de depistare sunt metode utilizate pentru a se detecta prezența dioxinelor și a PCB asemănători dioxinelor la concentrația de interes. Aceste metode au o capacitate mare de procesare a eșantioanelor și sunt utilizate pentru a tria un număr mare de eșantioane potențial pozitive. Sunt concepute special pentru a evita rezultatele fals negative.

Metodele de confirmare sunt metode care furnizează date complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a dioxinelor și a PCB-urilor asemănători dioxinelor la concentrația de interes.

2. Context

Având în vedere faptul că eșantioanele din mediu și cele biologice (inclusiv eșantioanele de furaje/materii prime furajere) conțin, în general, amestecuri complexe de diverși congeneri ai dioxinelor, a fost elaborat conceptul „factori de echivalență toxică” (TEF) pentru a facilita evaluarea riscurilor. Acești TEF au fost stabiliți pentru a exprima concentrațiile de amestecuri de PCDD și PCDF 2,3,7,8-substituiți și de PCB non-orto și mono-orto clor-substituiți care au o activitate asemănătoare dioxinei în echivalenți toxici (TEQ) de 2, 3, 7, 8-TCDD. Concentrațiile substanțelor individuale într-un eșantion anumit se înmulțesc cu valoarea TEF corespunzătoare și apoi se adună, pentru a se obține concentrația totală de compuși asemănători dioxinelor, exprimată ca TEQ.

Nu mai în sensul prezentului regulament, limita specifică de cuantificare acceptată pentru un congener individual este concentrația unui analit dintr-un extract de eșantion care produce un răspuns instrumental pentru doi ioni diferiți, care trebuie monitorizați printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul cel mai puțin sensibil, și îndeplinește condițiile de bază, cum sunt, de exemplu, timpul de retenție și raportul izotopic conform procedurii de determinare descrise în metoda EPA 1613, revizia B.

3. Cerințe de asigurare a calității care trebuie respectate în cursul pregătirii eșantioanelor

Se aplică dispozițiile generale privind prepararea eșantioanelor pentru analiză, stabilite în anexa II.

De asemenea, trebuie să se îndeplinească următoarele cerințe:

- Eșantioanele se păstrează și se transportă în recipiente din sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă. Din recipientul care conține eșantionul trebuie îndepărtate urmele de praf de hârtie. Sticlăria se clătește cu solvenți controlați în prealabil în vederea detectării dioxinelor.

⁽¹⁾ JO L 221, 17.8.2002, p. 8.

- Se efectuează o analiză martor prin efectuarea întregii proceduri analitice, dar omițând numai eșantionul.
- Greutatea eșantionului utilizat pentru extracție trebuie să fie suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la sensibilitate.

4. Cerințe aplicabile laboratoarelor

- Laboratoarele trebuie să demonstreze performanța unei metode în zona nivelului de interes, de exemplu de 0,5x, 1x și 2x nivelul de interes, cu un coeficient de variație acceptabil la repetarea analizei. Pentru detalii privind criteriile de acceptare, a se vedea punctul 5.
- Limita de cuantificare pentru o metodă de confirmare trebuie să se situeze într-un interval de o cincime din nivelul de interes, pentru a garanta că în intervalul nivelului de interes sunt îndepliniți coeficienți de variație acceptabili.
- Ca măsuri interne de control al calității, trebuie efectuate periodic controale martor, experimente cu eșantioane contaminate sau analize ale unor eșantioane de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat).
- Participarea cu succes la studii interlaboratoare, care evaluează competența laboratorului, este cea mai bună modalitate de a dovedi competența în efectuarea unor analize specifice. Totuși, participarea cu succes la studiile interlaboratoare, de exemplu pentru eșantioane de sol sau de ape reziduale, nu dovedește neapărat și competența în domeniul eșantioanelor de produse alimentare sau furaje, care prezintă niveluri de contaminare mai reduse. Din acest motiv este necesară participarea permanentă la studii interlaboratoare pentru determinarea dioxinelor și a PCB asemănători dioxinelor în structura alimentelor/furajelor în cauză.
- Laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu ghidul ISO 58, pentru a se asigura că laboratoarele în cauză aplică gradul necesar de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele se acreditează conform standardului ISO/IEC/17025.

5. Cerințe aplicabile procedurilor analitice pentru dioxine și PCB asemănători dioxinelor

Cerințe fundamentale pentru acceptarea procedurilor analitice:

- **Sensibilitate înaltă și limite de detecție joase.** Pentru PCDD și PCDF, cantitățile detectabile trebuie să fie de ordinul picogramelor TEQ (10^{-12} g) din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Este cunoscut faptul că PCB se află la niveluri mai ridicate decât PCDD și PCDF. Pentru majoritatea congenerilor de PCB, o sensibilitate de ordinul nanogramelor (10^{-9} g) este deja suficientă. Cu toate acestea, pentru măsurarea congenerilor PCB asemănători dioxinelor mai toxici (în special congeneri non-orto substituiți), trebuie să fie atinsă aceeași sensibilitate ca și pentru PCDD și PCDF.
- **Selectivitate (specificitate) înaltă.** Este necesară o distincție a PCDD, PCDF și PCB asemănători dioxinelor în raport cu o multitudine de alți compuși coextrași și cu posibile interferențe, prezenți în concentrații de până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților studiați. Pentru metodele de cromatografie în fază gazoasă/spectrometrie de masă (CG/SM), este necesară o distincție între diferiți congeneri, cum ar fi între compușii toxici (de exemplu, cei șaptesprezece PCDD și PCDF substituiți la 2,3,7,8 și PCB asemănători dioxinelor) și alții. Biotestele trebuie să permită determinarea selectivă a valorilor TEQ, ca sumă de PCDD, PCDF și PCB asemănători dioxinelor.
- **Acuratețe ridicată (veridicitate și precizie).** Este necesar ca determinarea să furnizeze o estimare validă și fiabilă a concentrației reale dintr-un eșantion. O acuratețe ridicată (acuratețea măsurătorii: gradul de apropiere dintre rezultatul unei măsurători și valoarea reală sau atribuită a mărimii de măsurat) este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unui eșantion din cauza fiabilității reduse a estimării TEQ. Acuratețea este exprimată ca veridicitate (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit dintr-un material certificat și valoarea certificată a acestuia, exprimată ca procentaj din această valoare) și precizie (RSD_R , deviația standard relativă, calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate).

Metodele de depistare pot include biotestele și metodele CG/SM; metodele de confirmare cuprind cromatografia în fază gazoasă de înaltă rezoluție/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRGC/HRMS).

Pentru valoarea totală TEQ, trebuie să se respecte următoarele criterii:

	Metode de depistare	Metode de confirmare
Rată de fals negative	< 1 %	
Veridicitate		- 20 % până la + 20 %
Precizie RSD _R	< 30 %	< 15 %

6. Cerințe specifice privind metodele CG/SM care trebuie respectate în scop de depistare sau de confirmare

- Adăugarea de etaloane interne de PCDD/F 2,3,7,8 clor-substituite și de PCB asemănători dioxinei marcate cu ¹³C trebuie să se efectueze chiar de la începutul efectuării metodei de analiză, de exemplu, înaintea extracției, pentru validarea procedurii analitice. Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra-octo-clorurate de PCDD/F și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB asemănători dioxinei (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă, utilizat pentru monitorizarea PCDD/F și a PCB asemănători dioxinei). Este necesar să existe o preferință clară, mai ales în cazul metodelor de confirmare, pentru utilizarea tuturor celor 17 etaloane interne de PCDD/F 2,3,7,8-clor-substituite marcate cu ¹³C și a tuturor celor 12 etaloane interne de PCB asemănători dioxinei marcate cu ¹³C.
- Se determină, de asemenea, factorii de răspuns relativ pentru acei congengeri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ¹³C, utilizând soluții de calibrare corespunzătoare.
- 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 ce conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înainte extracției, fie după extracția grăsimii. Se efectuează o validare adecvată a eficienței metodei de extracție, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne și de modul în care se consemnează rezultatele (în funcție de produs sau de grăsime).
- Înaintea analizei CG/SM, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).
- Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperarea etaloanelor interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și recuperări inferioare sau superioare pentru congengeri individuali, în special pentru dibenzodioxine și dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma dintre PCDD/F și PCB asemănători dioxinei). Pentru metodele de depistare, recuperarea trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.
- Separarea dioxinelor de compuși clorurați interferenți, cum sunt PCB neasemănători dioxinei și difenileterii 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 suficientă (< 25 % de la vârf la vârf între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Determinarea se realizează în conformitate cu metoda EPA 1613 revizuire B: dioxine și furani tetra-octoclorurați prin metoda de diluție a izotopilor HRGC/HRMS sau altă metodă cu criterii de performanță echivalente.
- Diferența dintre limita superioară și limita inferioară trebuie să nu depășească 20 % pentru furajele caracterizate de o contaminare cu dioxine situată în interval sau peste nivelul maxim de contaminare. Pentru furajele cu niveluri de contaminare mult sub nivelul maxim, diferența se poate situa în intervalul 25-40 %.

7. Metode analitice de depistare

7.1. Introducere

Se pot avea diferite abordări analitice utilizând o metodă de depistare: o abordare pur de depistare și o abordare cantitativă.

Abordare de depistare

Răspunsul eşantioanelor este comparată cu cea a unui eşantion de referință la nivelul de interes. Eşantioanele cu un răspuns inferior celui de referință sunt declarate negative, iar cele cu răspuns superior sunt presupuse pozitive. Cerințe:

- În fiecare serie de testări trebuie să se includă un eşantion martor și unul de referință, care se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Eşantionul de referință trebuie să prezinte un răspuns cu mult mai mare în comparație cu un martor.
- Se includ eşantioane de referință suplimentare de 0,5x și 2x nivelul de interes, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului de interes.
- Atunci când se testează alte matrice, trebuie să se demonstreze că eşantionul (eşantioanele) de referință sunt cele corespunzătoare, de preferință prin includerea eşantioanelor la care s-a dovedit prin HRGC/HRMS că au un nivel TEQ în jurul celui al eşantionului de referință sau, altfel, a unui martor contaminat la nivelul respectiv.
- Deoarece etaloanele interne nu se pot utiliza în bioteste, testele cu privire la repetabilitate sunt foarte importante, pentru a se obține informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste. Coeficientul de variație trebuie să fie inferior valorii de 30 %.
- pentru bioteste se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului.

Abordare cantitativă

Aceasta necesită o serie de diluții standard, procese de curățare și de măsurare duble sau triple, precum și controale de recuperare și ale martorului. Rezultatul poate fi exprimat ca TEQ, presupunându-se astfel că acei compuși care se află la originea semnalului corespund principiului TEQ. Acest lucru se poate realiza prin utilizarea TCDD (sau a unui amestec etalon de dioxină/furan/PCB asemănător dioxinei) pentru a se obține o curbă de calibrare pentru calculul nivelului TEQ din extract și, astfel, din eşantion. Cantitatea obținută se corectează apoi cu valoarea TEQ calculată pentru un eşantion martor (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și pentru recuperare (calculată pe baza valorii TEQ dintr-un eşantion de control al calității apropiată de limita de interes). Este esențial să se țină cont de faptul că o parte din aparenta pierdere de recuperare poate fi determinată de efectele matricei și/sau de diferențele dintre valorile TEF în bioteste și valorile TEF oficiale stabilite de OMS.

7.2. Cerințe privind metodele analitice pentru depistare

- Depistarea se poate face prin metode analitice CG/SM sau prin bioteste. Pentru metodele CG/SM, trebuie utilizate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru biotestele celulare se stabilesc cerințe specifice la punctul 7.3, iar pentru biotestele realizate cu ajutorul kiturilor de testat se stabilesc cerințe specifice la punctul 7.4.
- Sunt necesare informații privind numărul de rezultate fals pozitive și fals negative obținute pentru un set mare de eşantioane peste sau sub nivelul maxim sau nivelul de intervenție, prin comparație cu conținutul TEQ determinat printr-o metodă analitică de confirmare. Ratele efective de rezultate fals negative trebuie să se situeze sub 1 %. Rata de rezultate fals pozitive este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea instrumentului de depistare să fie avantajoasă.
- Rezultatele pozitive trebuie confirmate întotdeauna printr-o metodă analitică de confirmare (HRGC/HRMS). În plus, eşantioanele dintr-o gamă largă de TEQ se confirmă prin HRGC/HRMS (aproximativ 2-10 % din eşantioanele negative). Se furnizează informații privind corespondența dintre rezultatele biotestelor și cele ale HRGC/HRMS.

7.3. Cerințe specifice pentru bioteste celulare

- Când se execută un biotest, fiecare testare necesită o serie de concentrații de referință ale TCDD sau ale unui amestec de dioxină/furan (curbă de răspuns pentru o doză completă cu un $R^2 > 0,95$). Cu toate acestea, în scopuri de depistare se poate utiliza o curbă de nivel scăzut extinsă, pentru analiza eşantioanelor cu conținut scăzut.
- Pentru rezultatul biotestului într-un interval de timp constant se utilizează pe o foaie de control al calității o concentrație TCDD de referință (aproximativ de 3x limita de cuantificare). Ca alternativă, se poate utiliza drept referință răspunsul relativ al unui eşantion de referință comparat cu o curbă de calibrare TCDD, deoarece răspunsul celulelor poate depinde de mulți factori.
- Graficele de control al calității pentru fiecare tip de material de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că rezultatul este conform cu liniile directoare stabilite.

- În special pentru calculele cantitative, realizarea diluției eșantionului trebuie să se situeze în cadrul porțiunii liniare a curbei de răspuns. Eșantioanele situate deasupra porțiunii liniare a curbei de răspuns trebuie diluate și testate din nou. Prin urmare, se recomandă testarea a cel puțin trei diluții o dată.
- Procentul deviației standard nu depășește 15 % într-o determinare triplă pentru fiecare diluție a eșantionului și 30 % pentru trei experimente independente.
- Limita de detecție poate fi stabilită la de 3 ori valoarea deviației standard a solventului martor sau a răspunsului de fond. Altă abordare constă în aplicarea unui răspuns care se situează deasupra răspunsului de fond (factor de inducție de 5x martorul solventului), calculat din curba de calibrare a zilei. Limita de cuantificare poate fi stabilită ca o valoare de la 5x până la 6x deviația standard a martorului solventului sau a răspunsului de fond ori să se aplice un răspuns ce este clar superior răspunsului de fond (factor de inducție de 10x martorul solventului), calculat din curba de calibrare a zilei.

7.4. Cerințe specifice pentru biotestele realizate pe bază de kituri

- Este necesar să se garanteze că biotestele pe bază de kituri au o sensibilitate și o fiabilitate suficiente pentru a fi aplicate furajelor.
- Trebuie respectate instrucțiunile producătorului privind pregătirea și analiza eșantioanelor.
- Kiturile de testare nu se utilizează după data expirării.
- Nu se utilizează materiale sau componente destinate utilizării cu alte kituri.
- Kiturile de testare se păstrează la o temperatură de depozitare situată în cadrul unui interval specificat și se utilizează la temperatura de lucru specificată.
- Limita de detecție pentru imunodozări este determinată ca suma mediei și a valorii de 3x deviația standard, bazată pe o serie de 10 analize repetate ale martorului și care este împărțită la valoarea pantei ecuației de regresie liniară.
- Pentru testele realizate în laborator se utilizează etaloane de referință, pentru a garanta că răspunsul la etalon se situează într-un interval acceptabil.

8. Raportarea rezultatelor

În măsura în care procedura analitică utilizată permite acest lucru, rezultatele analitice conțin niveluri individuale ale congenerilor PCDD/F și PCB; rezultatele analitice se raportează ca limită inferioară, limită superioară și limită medie, pentru a se include un maximum de informații în raportarea rezultatelor, permițând astfel interpretarea rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.

Raportarea include, de asemenea, conținutul de lipide al eșantionului, precum și metoda utilizată pentru extracția lipidelor.

Trebuie să fie disponibile informații despre recuperările etaloanelor interne individuale, dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6, dacă depășesc nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.

Dat fiind că, atunci când se stabilește conformitatea eșantionului, este necesar să se țină cont de incertitudinea măsurării, acest parametru trebuie să fie de asemenea disponibil. De aceea, rezultatul analizei 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 dioxinelor și a PCB asemănători dioxinei, suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale dioxinelor și PCB asemănători dioxinei se utilizează pentru suma dioxinelor și a PCB asemănători dioxinei.

Dacă incertitudinea de măsurare se ia în considerare aplicându-se CCa (conform descrierii de la punctul I.2 din prezenta parte B), acest parametru se comunică.

ANEXA VI

METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA CONSTITUENȚILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL FURAJELOR**Condiții pentru detectarea, identificarea sau estimarea prin examinare microscopică a constituenților de origine animală în furaje****1. Obiectiv și domeniu de aplicare**

Prezentele condiții se utilizează în cazul în care detectarea constituenților de origine animală (definiți ca produse rezultate din prelucrarea carcaselor sau a unor părți din corpul mamiferelor, păsărilor de crescătorie sau peștilor) din furaje se realizează prin examinare microscopică în cadrul unui program de inspecție coordonat în domeniul nutriției animalelor, în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 882/2004 al Parlamentului European și al Consiliului⁽¹⁾. Pentru o mai bună detectare a anumitor tipuri de constituenți de origine animală sau pentru a se preciza originea constituenților de origine animală, se poate realiza o a doua analiză prin metode derivate sau metode alternative, cu condiția ca metodele din prezenta anexă să se utilizeze în toate analizele oficiale. În plus, se poate utiliza o variantă a protocolului în cazul în care se examinează anumiți constituenți de origine animală specifici, cum ar fi plasma sau oasele prezente în seu (a se vedea și punctul 9), cu condiția ca analizele respective să se realizeze în completarea analizelor prevăzute în programul de inspecție coordonată.

2. Sensibilitate

În funcție de natura constituenților de origine animală, este posibilă detectarea unor cantități foarte mici (< 0,1 %) în furaje.

3. Principiu

Pentru identificare se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile din anexa I și care a fost supus unei preparări adecvate. Protocolul descris în continuare este adecvat pentru tratarea furajelor cu un conținut mic de umiditate. Furajele cu un conținut de umiditate mai mare de 14 % se usucă (condensează) înaintea tratamentului. Furajele sau materiile prime furajere speciale (de exemplu, grăsimi, uleiuri) necesită un tratament specific (a se vedea punctul 9). Constituenții de origine animală se identifică pe baza caracteristicilor tipice, identificabile prin examinare microscopică (adică fibre musculare și alte particule de carne, cartilajii, oase, coarne, păr, păr de porc, sânge, pene, coji de ouă, oase și solzi de pește). Identificarea trebuie să se realizeze atât pentru fracția care a trecut prin sită (6.1), cât și pentru sedimentul concentrat (6.2) de eșantion.

4. Reactivi**4.1. Agent de includere**

4.1.1. Clorhidrat (soluție apoasă, 60 % g/v).

4.1.2. Leșie (NaOH 2,5 % g/v sau KOH 2,5 % g/v) pentru fracțiile cernute.

4.1.3. Ulei de parafină sau glicerol (vâscozitate: 68-81) pentru examinarea microscopică a sedimentului.

4.2. Agenți de clătire

4.2.1. Alcool, 96 %.

4.2.2. Acetonă.

4.3. Agent de concentrare

4.3.1. Tetracloretilenă (densitate 1,62).

⁽¹⁾ JO L 165, 20.4.2004, p. 1.

4.4. *Reactivi de colorare*

- 4.4.1. Soluție de iod/iodură de potasiu (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent).
- 4.4.2. 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).
- 4.4.3. Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml H₂O).
- 4.4.4. Soluție de iod/iodură de potasiu (dizolvată în etanol 70 %).

4.5. *Reactiv decolorant*

- 4.5.1 Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9,6 % clor activ).

5. **Echipament și accesorii**

- 5.1. Balanță analitică (precizie de 0,01 g, cu excepția sedimentului concentrat: 0,001 g).
- 5.2. Dispozitiv de măcinat (moară de măcinat sau mojar, în special pentru furaje ce conțin > 15 % grăsime, detectată la analiză).
- 5.3. Sită cu ochiuri pătrate cu lărgimea de maximum 0,5 mm.
- 5.4. Pâlnie de separare sau pahar de laborator de decantare cu fund conic.
- 5.5. Microscop stereoscopic (mărire de minimum 40 de ori).
- 5.6. Microscop compus (mărire de minimum 400 de ori), lumină transmisă sau lumină polarizată.
- 5.7. Sticlărie de laborator standard

Toată aparatura se curăță cu grijă. Pâlniile de separare și sticlăria se spală în mașina de spălat. Sitele se curăță cu o perie cu peri aspri.

6. **Procedură**

Dacă ambele fracții se analizează ca eșantioane individuale, furajele sub formă de pelete se cern în prealabil.

Cel puțin 50 g de eșantion se tratează [dacă este necesar, se macină cu grijă cu un dispozitiv de măcinare adecvat (5.2) pentru a obține o structură corespunzătoare]. Din materialul măcinat se iau două porțiuni reprezentative, una pentru fracția cernută (cel puțin 5 g) (6.1) și una pentru sedimentul concentrat (cel puțin 5 g) (6.2). Pentru identificare, se poate aplica suplimentar colorarea cu reactivi de colorare (6.3).

Pentru a indica natura proteinelor animale și originea particulelor, se poate utiliza un sistem de decizie asistată de tipul ARIES și pot fi documentate eșantioane de referință.

6.1. *Identificarea constituenților de origine animală din fracțiile cernute*

Un eșantion de cel puțin 5 g se cerne prin sită (5.3) în două fracții.

Fracția (fracțiile) cernută (cernute) cu particule mari (sau o parte reprezentativă a fracției) se aplică în strat subțire pe un suport adecvat și se examinează sistematic la microscopul stereoscopic (5.5) cu mărimi diferite pentru detectarea constituenților de origine animală.

Lamelele preparate cu fracția (fracțiile) cu particule fine se examinează sistematic la microscopul compus (5.6) cu mărimi diferite pentru detectarea constituenților de origine animală.

6.2. *Identificarea constituenților de origine animală din sedimentul concentrat*

Cel puțin 5 g (cu o precizie de până la 0,01 g) de eșantion se transferă într-o pâlnie de separare sau într-un vas de laborator de decantare cu fund conic și se tratează cu cel puțin 50 ml tetracloretilenă (4.3.1). Amestecul se agită sau se amestecă de mai multe ori.

- Dacă se utilizează o pâlnie de separare închisă, sedimentul se lasă să stea un timp suficient (cel puțin trei minute) înainte de a fi separat. Se repetă agitarea și sedimentul se lasă iar să stea timp de cel puțin trei minute. Se separă din nou sedimentul.
- Dacă se utilizează un pahar de laborator deschis, sedimentul se lasă să stea cel puțin cinci minute înainte de a fi separat.

Sedimentul total se usucă și apoi se cântărește (cu o precizie de 0,001 g). Cântărirea este necesară doar dacă este necesară o estimare. Dacă sedimentul conține multe particule mari, se poate cerne printr-o sită (5.3) în două fracții. Sedimentul uscat se examinează la microscopul stereoscopic (5.5) și la microscopul compus (5.6) pentru detectarea constituenților osoși.

6.3. *Utilizarea agenților de includere și a reactivilor de colorare*

Pentru a facilita identificarea la microscop a constituenților de origine animală se pot utiliza agenți de includere și reactivi de colorare speciali.

Clorhidrat (4.1.1): Prin încălzire cu atenție, structurile celulare se văd mai clar, ca urmare a faptului că granulele de amidon se gelatinizează, iar conținuturile celulare nedorite sunt eliminate.

Leșie (4.1.2): Atât hidroxidul de sodiu, cât și hidroxidul de potasiu limpezesc materialul furajului, facilitând detecția fibrelor musculare, a părului sau a altor structuri cheratinoase.

Ulei de parafină și glicerol (4.1.3): Constituenții osoși pot fi identificați bine în acest agent de includere pentru că majoritatea lacunelor rămân umplute cu aer și apar sub formă de găuri negre de aproximativ 5-15 μm.

Soluție de iod/iodură de potasiu (4.4.1): Se utilizează pentru detecția amidonului (culoare albastră-violetă) și a proteinelor (culoare galbenă-portocalie). Dacă este necesar, soluțiile pot fi diluate.

Soluție de roșu de alizarină (4.4.2): Colorație roșie/roz a oaselor, precum și a oaselor și solzilor de pește. Înainte de uscarea sedimentului (a se vedea 6.2), întregul sediment se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de alcool (4.2.1) (de fiecare dată se utilizează un agitator, solventul se lasă să stea timp de aproximativ un minut și se elimină). Înainte de a utiliza acest reactiv de colorare, sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu (4.5.1). Se permite ca reacția să continue timp de 10 minute. Eprubeta se umple cu apă, se așteaptă timp de 2-3 minute ca sedimentul să se decanteze, iar apa și particulele în suspensie se elimină. Sedimentul se clătește de încă două ori cu aproximativ 10 ml de apă (de fiecare dată se utilizează un agitator, se lasă să stea și apoi se elimină apa). Se adaugă două până la zece sau mai multe picături (în funcție de cantitatea de reziduu) de soluție de roșu de alizarină. Amestecul se agită și se permite desfășurarea reacției timp de câteva secunde. Sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de alcool (4.2.1), apoi o dată cu acetonă (4.2.2) (de fiecare dată se utilizează un agitator, solventul se lasă să stea timp de aproximativ un minut și se elimină). Astfel sedimentul este pregătit pentru a fi uscat.

Reactiv cistină (4.4.3): Prin încălzire cu atenție, constituenții care conțin cistină (păr, pene etc.) devin de culoare negru-marou.

6.4. *Examinarea furajelor susceptibile de a conține făină de pește*

Se examinează la microscopul compus (6.1 și 6.2) cel puțin o lamelă din fracția fină cernută și din fracția fină de sediment.

Dacă eticheta indică prezența făinii de pește în ingrediente sau dacă se suspectează sau se detectează prezența făinii de pește la examinarea inițială, se examinează cel puțin încă două lamele cu fracție fină cernută din eșantionul original, precum și fracția de sediment total.

7. **Calcul și evaluare**

Statele membre se asigură că procedurile descrise la prezentul punct sunt utilizate pentru toate analizele oficiale în vederea estimării cantității (și nu doar a prezenței) constituenților de origine animală.

Calculul se poate realiza doar în cazul în care constituenții de origine animală conțin fragmente osoase.

Fragmentele osoase ale speciilor terestre cu sânge cald (de exemplu, mamifere și păsări) se pot distinge de diferitele tipuri de os de pește pe o lamelă microscopică, cu ajutorul lacunei tipice. Proporția de constituenți de origine animală din eșantion se estimează luând în considerare următoarele:

- proporția estimată (% greutate) de fragmente osoase în sedimentul concentrat; și
- proporția (% greutate) de os din constituenții de origine animală.

Pentru estimare trebuie să se examineze (dacă este posibil) cel puțin trei lamele și cel puțin cinci câmpuri pentru fiecare lamelă. În furajele combinate, sedimentul concentrat conține de regulă nu numai fragmente de oase de animale terestre și de oase de pește, ci și alte particule cu greutate specifică mare, cum ar fi minerale, nisip, fragmente de plante lignificate și altele.

7.1. Valoarea estimată a procentajului de fragmente osoase

% de fragmente de oase de animale terestre = $(S \times c)/g$

% de fragmente de oase și solzi de pește = $(S \times d)/g$

[S = greutatea sedimentului (mg), c = factor de corecție (%) pentru porțiunea estimată de oase de animale terestre din sediment, d = factor de corecție (%) pentru porțiunea estimată de fragmente de oase și solzi de pește din sediment, g = greutatea eșantionului pentru sedimentare (mg)].

7.2. Valoarea estimată a constituenților de origine animală

Proporția de os din produsele de origine animală poate să varieze foarte mult. (Procentajul de os este de ordinul a 50-60 % în cazul făinii de oase și de 20-30 % în cazul făinii de carne; în cazul făinurilor de pește, conținutul de os și de solzi variază în funcție de categoria și de originea făinii de pește, fiind de regulă de ordinul a 10-20 %).

Dacă tipul făinii de origine animală prezente în eșantion este cunoscut, este posibil să se estimeze conținutul:

Conținutul estimat de constituenți al produselor din animale terestre (%) = $(S \times c)/(g \times f) \times 100$

Conținutul estimat de constituenți al produselor din pește (%) = $(S \times d)/(g \times f) \times 100$

[S = greutatea sedimentului (mg), c = factor de corecție (%) pentru porțiunea estimată de constituenți de oase de animale terestre din sediment, d = factor de corecție (%) pentru porțiunea estimată de fragmente de oase și solzi de pește din sediment, f = factor de corecție pentru proporția de oase din constituenții de origine animală din eșantionul examinat, g = greutatea eșantionului pentru sedimentare (mg)].

8. Exprimarea rezultatelor examinării

Raportul conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din animale terestre și din făină de pește. Diferitele cazuri se raportează în modul următor:

8.1. Referitor la prezența constituenților derivați din animale terestre:

- în măsura în care a fost perceptibil la microscop, în eșantionul analizat nu a fost detectat niciun constituent derivat din animale terestre;

sau

- în măsura în care a fost perceptibil la microscop, în eșantionul analizat au fost detectați constituenți derivați din animale terestre.

8.2. Și, referitor la prezența făinii de pește:

- în măsura în care a fost perceptibil la microscop, niciun constituent derivat din pește nu a fost detectat în eșantionul analizat;

sau

- în măsura în care a fost perceptibil la microscop, în eșantionul analizat au fost detectați constituenți derivați din pește.

Dacă sunt detectați constituenți derivați din pește sau din animale terestre, raportul privind rezultatele examinării, dacă este necesar, poate să indice o estimare a cantității de componente detectate (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % sau > 5 %), alte specificații privind tipul animalului terestru, dacă este posibil, precum și constituenții de origine animală identificați (fibre musculare, cartilaj, oase, coarne, păr, peri de porc, pene, sânge, coji de ouă, oase de pește, solzi).

Pentru cazul în care se estimează cantitatea de constituenți de origine animală, se menționează factorul de corecție f utilizat.

Pentru cazul în care se identifică componente osoase derivate din animalele terestre, raportul conține mențiunea suplimentară:

„Nu se poate exclude posibilitatea provenienței din mamifere a constituenților menționați anterior.”

Această mențiune suplimentară nu este necesară în cazurile în care fragmentele osoase provenite de la animale terestre sunt specificate ca fragmente osoase provenite de la păsări de crescătorie sau mamifere.

9. **Protocol facultativ pentru analiza grăsimilor sau a uleiurilor**

Pentru analiza grăsimilor sau a uleiurilor se poate utiliza următorul protocol:

- Dacă grăsimea este solidă, aceasta se încălzește, de exemplu într-un cuptor cu microunde, până când devine lichidă.
- Cu ajutorul unei pipete, se transferă 40 ml de grăsime din partea inferioară a eșantionului într-un tub de centrifugă.
- Se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 rpm.
- Dacă grăsimea se solidifică după centrifugare, aceasta se încălzește încă o dată într-un cuptor până când devine lichidă. Se repetă centrifugarea timp de cinci minute la 4 000 rpm.
- Cu ajutorul unei linguri mici sau al unei spatule, se transferă jumătate din impuritățile decantate într-o placă Petri sau pe o lamelă de microscop pentru identificarea microscopică a unui posibil conținut de constituenți de origine animală (fibre de carne, pene, fragmente osoase ș.a.). Ca agent de includere pentru microscopie, se recomandă uleiul de parafină sau glicerolul.
- Impuritățile rămase se utilizează pentru sedimentare, conform descrierii de la punctul 6.2.

ANEXA VII

METODĂ DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A HRANEI PENTRU PĂȘĂRILE 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_{20} 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)
- 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, C₁₈, 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 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 reziduul 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 diclormetan (3.1). Se agită timp de 1 minut și se așteaptă separarea fazelor. Se evacuează stratul inferior (diclormetan) într-un balon cu fundul rotund de 500 ml. Se repetă extracția fazei apoase cu alte două porții de 70 ml de diclormetan și se combină aceste extracte cu primul în balonul cu fund rotund.

Se evaporă extractul de diclormetan până la uscare pe evaporatorul rotativ (4.2) la presiune scăzută și la temperatura de 40 °C. Se dizolvă reziduul 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 μ l.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (3.7.3) conținând 4 μ g/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 μ g/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 μ g/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.6.2).

Conținutul de metil benzoat w (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

unde:

c = concentrația de metil benzoat din soluția de eșantion, în $\mu\text{g/ml}$;

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 $\mu\text{g/ml}$.

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 benzoat adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de metil benzoat din extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de metil benzoat se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lățimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lățimea 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) 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 absorbanța 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 absorbanța 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 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 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 benzoat 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

	Martor	Făină 1	Pelete 1	Făină 2	Pelete 2
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-N¹,N⁴-dioxid

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de olaquinox din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg.

2. Principiu

Eșantionul se extrage cu un amestec apă și metanol. Conținutul de olaquinox 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, 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-metilquinoxalină-N¹,N⁴-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, C₁₈, 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 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 $\mu\text{g/ml}$ 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:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

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:

- 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 $\pm 2 \text{ nm}$;
- 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;
- 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% .

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, $c = 1,6 \text{ mol/l}$
- 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.
- 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-metilpiridină, E 750 (a se vedea 9.2)
- 3.7.1. Soluție etalon stoc de amprolium, 500 $\mu\text{g/ml}$
- 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 $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, soluția este stabilă timp de o lună.
- 3.7.2. Soluție etalon intermediară de amprolium, 50 $\mu\text{g/ml}$
- 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 $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, 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. Furaj martor
- Pentru efectuarea testului de recuperare (5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența de amprolium și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze amprolium sau substanțe interferente.

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 < 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

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 $\mu\text{g/ml}$;

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 $\mu\text{g/ml}$.

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 $\pm 10\%$ 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 $\pm 2\text{ nm}$;
- (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 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 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 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 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.

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 acetoneitril 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-quinoxalinilmetilenă)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, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6$
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).
- 3.11. Substanța etalon
Carbadox pur: metil 3-(2-quinoxalinilmetilenă)carbazat N^1, N^4 -dioxid, E 850
- 3.11.1. Soluție etalon stoc de carbadox, $100 \mu\text{g/ml}$ (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 $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$.
- 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 μ l
- 4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm \times 4 mm, C₁₈, particule de 10 μ m 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 μ m.
- 4.6. Filtru cu membrană, 0,45 μ m.
- 4.7. Baie cu ultrasunete.

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. Furaje

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 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 croma- 300 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 10 µm sau echivalent
tografie lichidă coloană
(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 detecție: 365 nm
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.

6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de carbadox din soluția de eșantion se determină concentrația de carbadox, în µg/ml, a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (5.4.2).

6.1. *Furaje*

Conținutul de carbadox 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 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 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. Lățimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lățimea inițială.

7.1.2. *Detecrie cu grup de diode*

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- 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 ± 2 nm;
- 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;
- 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
CV_R (%)	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_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.

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

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

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

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

AVIZ CITITORILOR

Instituțiile au hotărât să nu mai menționeze, în textele lor, ultima modificare a actelor citate.

În lipsa unor dispoziții contrare, actele la care se face trimitere în textele publicate se consideră ca fiind actele în versiunea în vigoare a acestora.