Επίσημη Εφημερίδα
της Ευρωπαϊκής Ένωσης

EL
Σειρά L

2024/771

15.3.2024

ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2024/771 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 29ης Φεβρουαρίου 2024

για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/625 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 15ης Μαρτίου 2017, για τους επίσημους ελέγχους και τις άλλες επίσημες δραστηριότητες που διενεργούνται με σκοπό την εξασφάλιση της εφαρμογής της νομοθεσίας για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και των κανόνων για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων, την υγεία των φυτών και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, για την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 999/2001, (ΕΚ) αριθ. 396/2005, (ΕΚ) αριθ. 1069/2009, (ΕΚ) αριθ. 1107/2009, (ΕΕ) αριθ. 1151/2012, (ΕΕ) αριθ. 652/2014, (ΕΕ) 2016/429 και (ΕΕ) 2016/2031, των κανονισμών του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1/2005 και (ΕΚ) αριθ. 1099/2009 και των οδηγιών του Συμβουλίου 98/58/ΕΚ, 1999/74/ΕΚ, 2007/43/ΕΚ, 2008/119/ΕΚ και 2008/120/ΕΚ και για την κατάργηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, των οδηγιών του Συμβουλίου 89/608/ΕΟΚ, 89/662/ΕΟΚ, 90/425/ΕΟΚ, 91/496/ΕΟΚ, 96/23/ΕΚ, 96/93/ΕΚ και 97/78/ΕΚ και της απόφασης 92/438/ΕΟΚ του Συμβουλίου (κανονισμός για τους επίσημους ελέγχους) ([1]), και ιδίως το άρθρο 34 παράγραφος 6,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 152/2009 της Επιτροπής ([2]) καθορίζει τις μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών.

(2) Οι μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης που θεσπίστηκαν με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 152/2009 θα πρέπει να προσαρμοστούν στην πρόοδο της επιστημονικής και τεχνολογικής γνώσης. Με τον παρόντα κανονισμό θα πρέπει να εισαχθούν αρκετές ήσσονος σημασίας αλλαγές, λαμβάνοντας υπόψη την πείρα που αποκτήθηκε με την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης ή για την παροχή διευκρινίσεων σε ορισμένες διατάξεις.

(3) Η μέθοδος δειγματοληψίας που περιγράφεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 152/2009 δεν είναι κατάλληλη για τη δειγματοληψία για τον έλεγχο της μικροβιολογικής μόλυνσης και, ως εκ τούτου, εξαιρείται από το πεδίο εφαρμογής. Ωστόσο, δεδομένου ότι με την τροποποίηση με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 691/2013 της Επιτροπής ([3]) δεν εξαιρούνταν πλέον ρητά από το πεδίο εφαρμογής, αυτό οδήγησε σε κάποια σύγχυση και, ως εκ τούτου, είναι σκόπιμο να εξαιρεθεί και πάλι ρητά από το πεδίο εφαρμογής.

(4) Είναι σκόπιμο να θεσπιστούν ειδικές διατάξεις για τη δειγματοληψία ζωοτροφών που παρέχονται προς πώληση από τους υπευθύνους επιχειρήσεων ζωοτροφών με εξ αποστάσεως πώληση, δεδομένου ότι αυξάνεται η πώληση ζωοτροφών με εξ αποστάσεως επικοινωνία. Πέραν των διατάξεων σχετικά με την αβεβαιότητα των αναλυτικών μετρήσεων και την ανάκτηση στην περίπτωση της ανάλυσης ανεπιθύμητων ουσιών, οι εν λόγω διατάξεις θα πρέπει επίσης να εισαχθούν για την ανάλυση της περιεκτικότητας των πρόσθετων υλών ζωοτροφών, δεδομένου ότι οι εν λόγω διατάξεις είναι επίσης συναφείς στην περίπτωση αυτή. Με βάση τα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό της ουρίας εκτός του πεδίου εφαρμογής της έγκρισης της ουρίας ως πρόσθετης ύλης ζωοτροφών παράγει εσφαλμένα αποτελέσματα ανάλυσης, θα πρέπει να προσδιοριστεί το πεδίο εφαρμογής της εν λόγω μεθόδου και να προστεθούν πληροφορίες σχετικά με την αξιολόγηση της μεθόδου και τα αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης.

(5) Αρκετές μέθοδοι ανάλυσης που θεσπίστηκαν με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 152/2009 θα πρέπει να διαγραφούν, δεδομένου ότι δεν ισχύουν πλέον για τον σκοπό για τον οποίο προορίζονται. Η μέθοδος ανάλυσης για τον προσδιορισμό των πτητικών αζωτούχων βάσεων και η μέθοδος για τον προσδιορισμό των ανθρακικών αλάτων θα πρέπει να διαγραφούν διότι δεν υφίσταται πλέον νομική απαίτηση για έλεγχο της συμμόρφωσης στην ενωσιακή νομοθεσία για τις ζωοτροφές. Η υφιστάμενη μέθοδος ανάλυσης για τον προσδιορισμό του diclazuril (δικλαζουρίλη) περιέχει λάθη διατύπωσης και, ως εκ τούτου, δεν παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα ανάλυσης. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να αντικατασταθεί από μια

([1]) ΕΕ L 95 της 7.4.2017, σ. 1.
([2]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 152/2009 της Επιτροπής, της 27ης Ιανουαρίου 2009, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών (ΕΕ L 54 της 26.2.2009, σ. 1).
([3]) Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 691/2013 της Επιτροπής, της 19ης Ιουλίου 2013, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 όσον αφορά τις μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης (ΕΕ L 197 της 20.7.2013, σ. 1).

προσαρμοσμένη μέθοδο για την οποία έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι νέες μέθοδοι ανάλυσης για την ανάλυση της ελεύθερης και ολικής γκοσσυπόλης παρείχαν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η μέθοδος ανάλυσης για τον προσδιορισμό της ελεύθερης και ολικής γκοσσυπόλης που θεσπίστηκε με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 152/2009 δεν παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα και, ως εκ τούτου, η εν λόγω μέθοδος θα πρέπει να διαγραφεί και να αντικατασταθεί από παραπομπή σε ευρωπαϊκά πρότυπα (πρότυπα ΕΝ). Οι μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο της παράνομης παρουσίας πρόσθετων υλών των οποίων η χρήση δεν επιτρέπεται πλέον στις ζωοτροφές θα πρέπει να διαγραφούν, καθώς έκτοτε έχουν αναπτυχθεί πιο ευαίσθητες προσεγγίσεις διερευνητικού ελέγχου καθώς και πιο ευαίσθητες μέθοδοι ανάλυσης.

(6) Εκτός από τις αναλυτικές μεθόδους που περιγράφονται στα παραρτήματα του παρόντος κανονισμού, θα πρέπει επίσης να γίνεται αναφορά στα πρότυπα ΕΝ όσον αφορά τη χρήση στους επίσημους ελέγχους.

(7) Δεδομένου ότι με τον εκτελεστικό κανονισμό (ΕΕ) 2021/2047 της Επιτροπής ([4]) εγκρίθηκε η νέα πρόσθετη ύλη ζωοτροφών amprolium (αμπρόλιο), στο παράρτημα IV του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 θα πρέπει να προστεθεί μέθοδος ανάλυσης για τον προσδιορισμό του αμπρολίου.

(8) Δεδομένου ότι οι τροποποιήσεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009 είναι ουσιαστικές και αφορούν πολλαπλές διατάξεις των παραρτημάτων του, είναι σκόπιμο, για λόγους σαφήνειας, τα εν λόγω παραρτήματα να αντικατασταθούν στο σύνολό τους.

(9) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής φυτών, ζώων, τροφίμων και ζωοτροφών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Τροποποιήσεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 152/2009

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 152/2009 τροποποιείται ως εξής:

1) Στο άρθρο 1, η πρώτη παράγραφος αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

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

(*) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2003, για τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων (ΕΕ L 268 της 18.10.2003, σ. 29).
(**) Οδηγία 2002/32/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 7ης Μαΐου 2002, σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες στις ζωοτροφές (ΕΕ L 140 της 30.5.2002, σ. 10).».

2) Το παράρτημα I αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος I του παρόντος κανονισμού.

3) Το παράρτημα II αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος II του παρόντος κανονισμού.

4) Το παράρτημα III αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος III του παρόντος κανονισμού.

5) Το παράρτημα IV αντικαθίσταται από το κείμενο που παρατίθεται στο παράρτημα IV του παρόντος κανονισμού.

6) Το παράρτημα V αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος V του παρόντος κανονισμού.

7) Το παράρτημα VII αντικαθίσταται από το κείμενο που παρατίθεται στο παράρτημα VI του παρόντος κανονισμού.

8) Το παράρτημα VIII απαλείφεται.

([4]) Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2021/2047 της Επιτροπής, της 23ης Νοεμβρίου 2021, σχετικά με τη χορήγηση άδειας για το υδροχλωρικό αμπρόλιο (COXAM) ως πρόσθετης ύλης ζωοτροφών για κοτόπουλα προς πάχυνση και κοτόπουλα εκτρεφόμενα για ωοπαραγωγή (κάτοχος της άδειας: Huvepharma NV) (ΕΕ L 418 της 24.11.2021, σ. 13).

Άρθρο 2

Έναρξη ισχύος

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

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

Βρυξέλλες, 29 Φεβρουαρίου 2024.

Για την Επιτροπή
Η Πρόεδρος
Ursula VON DER LEYEN

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

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

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

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

Η δειγματοληψία μπορεί επίσης να περιλαμβάνει ζωοτροφές που παρέχονται προς πώληση από επιχειρήσεις ζωοτροφών με εξ αποστάσεως πώληση σύμφωνα με το άρθρο 11 παράγραφος 3 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 767/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ([1]). Η δειγματοληψία των ζωοτροφών που παρέχονται προς πώληση με εξ αποστάσεως πώληση υπόκειται καταρχήν στα σημεία που καθορίζονται στο παρόν παράρτημα. Ειδικές πτυχές της δειγματοληψίας των δειγμάτων από εξ αποστάσεως πώληση περιγράφονται στο σημείο 11.

2. ΟΡΙΣΜΟΙ

— Παρτίδα: προσδιορισμένη ποσότητα ζωοτροφών που έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως καταγωγή, ποικιλία, είδος συσκευασίας, συσκευαστή, αποστολέα ή επισήμανση και, όταν πρόκειται για διεργασία παραγωγής, μια μονάδα παραγωγής προερχόμενη από μία μόνο εγκατάσταση παραγωγής, στην οποία χρησιμοποιούνται ενιαίες παράμετροι παραγωγής, ή ένας ορισμένος αριθμός τέτοιων μονάδων, όταν παράγονται σε συνεχή σειρά και αποθηκεύονται μαζί.

— Δειγματιζόμενο τμήμα: παρτίδα ή προσδιορισμένο μέρος της παρτίδας ή υποπαρτίδα.

— Σφραγισμένο δείγμα: δείγμα το οποίο σφραγίζεται κατά τρόπο που εμποδίζει την πρόσβαση στο δείγμα χωρίς θραύση ή αφαίρεση της σφραγίδας.

— Μερική ποσότητα (δόση) δείγματος: ποσότητα λαμβανόμενη από ένα σημείο του δειγματιζόμενου τμήματος.

— Συνολικό δείγμα: άθροισμα των μερικών ποσοτήτων δείγματος που έχουν ληφθεί από το ίδιο δειγματιζόμενο τμήμα.

— Μειωμένο δείγμα: μέρος του συνολικού δείγματος, το οποίο προκύπτει από αυτό με διαδικασία αντιπροσωπευτικής μείωσης.

— Τελικό δείγμα: μέρος του συνολικού δείγματος (αναμεμειγμένο), του μειωμένου δείγματος ή του ομογενοποιημένου συνολικού δείγματος, ανάλογα με τον τύπο του ελέγχου (βλέπε σημείο 9.4).

— Εργαστηριακό δείγμα: δείγμα που προορίζεται για το εργαστήριο (όπως παραλαμβάνεται από το εργαστήριο) και μπορεί να είναι τελικό, μειωμένο ή συνολικό δείγμα.

— Δείγμα πώλησης εξ αποστάσεως: δείγμα παρτίδας ζωοτροφών που παρέχεται προς πώληση εξ αποστάσεως.

([1]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 767/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 13ης Ιουλίου 2009, για τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση ζωοτροφών, την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, και την κατάργηση των οδηγιών 79/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 80/511/ΕΟΚ της Επιτροπής, 82/471/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 83/228/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 93/74/ΕΟΚ του Συμβουλίου, 93/113/ΕΚ του Συμβουλίου, 96/25/ΕΚ του Συμβουλίου, και της απόφασης 2004/217/ΕΚ της Επιτροπής (ΕΕ L 229 της 1.9.2009, σ. 1).

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

— τα δείγματα λαμβάνονται από πρόσωπα εξουσιοδοτημένα για τον σκοπό αυτόν από την αρμόδια αρχή.

— Για δείγμα πώλησης εξ αποστάσεως, η αρμόδια αρχή ζητεί μια ποσότητα ζωοτροφών από την επιχείρηση ζωοτροφών μέσω επικοινωνίας εξ αποστάσεως.

— Τα δείγματα πρέπει να σφραγίζονται κατά τρόπο που εμποδίζει την πρόσβαση στο δείγμα χωρίς θραύση ή αφαίρεση της σφραγίδας.

  Το σήμα της σφραγίδας θα πρέπει να είναι αναγνωρίσιμο με βεβαιότητα και ευδιάκριτο.

— Ταυτοποίηση του δείγματος: το δείγμα πρέπει να φέρει ανεξίτηλη σήμανση και να ταυτοποιείται κατά τρόπο που να το συνδέει σαφώς με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

— Από κάθε συνολικό ή μειωμένο δείγμα λαμβάνονται τα ακόλουθα τελικά δείγματα:πρέπει να λαμβάνεται ένα για τον έλεγχο (επιβολή της νομοθεσίας) και ένα για την επιχείρηση ζωοτροφών (δείγμα ως μέσο άμυνας). Είναι δυνατόν να ληφθεί και ένα άλλο τελικό δείγμα ως δείγμα αναφοράς. Σε περίπτωση ομογενοποίησης του πλήρους συνολικού δείγματος, τα τελικά δείγματα λαμβάνονται από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα, εκτός εάν η διαδικασία αυτή αντίκειται στους κανόνες των κρατών μελών για τα δικαιώματα των επιχειρήσεων ζωοτροφών.

— Σύμφωνα με το άρθρο 15 παράγραφοι 1 και 2 του κανονισμού (ΕΕ) 2017/625, όταν είναι αναγκαίο για τη διενέργεια επίσημης δειγματοληψίας, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων ζωοτροφών, όταν τους ζητείται από τις αρμόδιες αρχές:

  — παρέχουν στο προσωπικό των αρμόδιων αρχών πρόσβαση στον εξοπλισμό που βρίσκεται υπό τον έλεγχό τους, συμπεριλαμβανομένης, εφόσον απαιτείται, της διάθεσης κατάλληλου εξοπλισμού δειγματοληψίας και εξοπλισμού ατομικής προστασίας·

  — επικουρούν και συνεργάζονται με το προσωπικό των αρμόδιων αρχών προκειμένου να καταστεί δυνατή η δειγματοληψία, μεταξύ άλλων παρέχοντας στο προσωπικό των αρμόδιων αρχών πρόσβαση στις ζωοτροφές.

4. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

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

4.2. **Συνιστώμενος εξοπλισμός για τη δειγματοληψία στερεών ζωοτροφών.**

4.2.1. *Μη μηχανική δειγματοληψία*

4.2.1.1. Φτυάρι με επίπεδο πυθμένα και κατακόρυφες πλευρές.

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

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

4.2.2. *Μηχανική δειγματοληψία*

Για τη δειγματοληψία ρευσών ζωοτροφών επιτρέπεται να χρησιμοποιείται κατάλληλος μηχανικός εξοπλισμός. Ο μηχανικός εξοπλισμός θεωρείται κατάλληλος όταν λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον από ολόκληρη τη διατομή που καταλαμβάνει η ροή.

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

4.2.3. *Διαιρέτης*

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

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

— Οι ποσοτικές απαιτήσεις των σημείων 5.1 και 5.2, όσον αφορά τον αριθμό των μερικών ποσοτήτων δείγματος, ισχύουν για δειγματιζόμενα τμήματα που δεν υπερβαίνουν τους 500 τόνους και από τα οποία μπορούν να ληφθούν δείγματα με αντιπροσωπευτικό τρόπο. Η περιγραφόμενη διαδικασία δειγματοληψίας ισχύει και για ποσότητες μεγαλύτερες από το καθοριζόμενο μέγιστο μέγεθος δειγματιζόμενου τμήματος, υπό τον όρο ότι αγνοείται ο μέγιστος αριθμός μερικών ποσοτήτων δείγματος που παρατίθεται στους κατωτέρω πίνακες στα σημεία 5.1.1, 5.1.3 και 5.1.5, και ότι ο αριθμός των μερικών ποσοτήτων δείγματος προσδιορίζεται από τον τύπο εξαγωγής τετραγωνικής ρίζας που περιλαμβάνεται στο αντίστοιχο τμήμα της διαδικασίας (βλέπε σημείο 5.3), ενώ αυξάνεται αναλόγως το ελάχιστο μέγεθος συνολικού δείγματος. Αυτό δεν αποκλείει τη διαίρεση μεγάλων παρτίδων σε μικρότερες υποπαρτίδες και τη δειγματοληψία από κάθε υποπαρτίδα με τη διαδικασία που περιγράφεται στα σημεία 5.1 και 5.2.

— Το μέγεθος του δειγματιζόμενου τμήματος πρέπει να καθιστά εφικτή τη δειγματοληψία από όλα τα μέρη που το αποτελούν.

— Για πολύ μεγάλες παρτίδες ή υποπαρτίδες (άνω των 500 τόνων) και για παρτίδες οι οποίες μεταφέρονται ή αποθηκεύονται με τρόπο που δεν επιτρέπει τη δειγματοληψία με τη διαδικασία δειγματοληψίας που προβλέπεται στα σημεία 5.1 και 5.2 του παρόντος κεφαλαίου, πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 5.3.

— Για τα δείγματα πώλησης εξ αποστάσεως, το μέγεθος της παρτίδας από την οποία ζητείται η ποσότητα συνήθως δεν είναι γνωστό στην αρμόδια αρχή. Ως εκ τούτου, η διαδικασία που αναφέρεται στα σημεία 5.1 και 5.2 δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Στην περίπτωση αυτή, εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 11.

— Εάν η νομοθεσία επιβάλλει στη επιχείρηση ζωοτροφών υποχρέωση συμμόρφωσης με τον παρόντα κανονισμό στο πλαίσιο υποχρεωτικού συστήματος παρακολούθησης, η επιχείρηση ζωοτροφών μπορεί να αποκλίνει από τις ποσοτικές απαιτήσεις του παρόντος σημείου, προκειμένου να λάβει υπόψη επιχειρησιακά χαρακτηριστικά, υπό τον όρο ότι έχει αποδείξει κατά τρόπο που ικανοποιεί την αρμόδια αρχή την ισοδυναμία της διαδικασίας δειγματοληψίας από πλευράς αντιπροσωπευτικότητας και έχει λάβει σχετική άδεια από την αρμόδια αρχή.

— Σε έκτακτες περιπτώσεις, εάν δεν είναι δυνατή η εφαρμογή της καθοριζόμενης μεθόδου δειγματοληψίας ως προς τις ποσοτικές απαιτήσεις, επειδή προκαλείται εμπορικά απαράδεκτη ζημία στην παρτίδα (λόγω της μορφής της συσκευασίας, του μέσου μεταφοράς, του τρόπου αποθήκευσης κ.λπ.), επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικής μεθόδου δειγματοληψίας, υπό τον όρο ότι είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερη και ότι περιγράφεται και τεκμηριώνεται πλήρως.

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

5.1.1. *Ασυσκεύαστες (χύμα) στερεές ζωοτροφές*

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

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

5.1.2. *Ασυσκεύαστες υγρές ζωοτροφές*

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

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

5.1.3. *Συσκευασμένες ζωοτροφές*

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

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

(*) Εάν το άνοιγμα μιας μονάδας ενδέχεται να επηρεάσει την ανάλυση (π.χ. ευαλλοίωτες υγρές ζωοτροφές), μερική ποσότητα δείγματος είναι η άθικτη μονάδα.
(**) Στην περίπτωση των μονάδων με περιεχόμενο που δεν υπερβαίνει το 1 kg ή το 1 λίτρο, μερική ποσότητα δείγματος είναι το περιεχόμενο μιας αρχικής μονάδας.
(***) Όταν ο αριθμός που προκύπτει είναι κλασματικός, στρογγυλοποιείται προς τα άνω στον πλησιέστερο ακέραιο.

5.1.4. *Κτηνοτροφικές πλάκες και πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων*

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

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

5.1.5. *Χορτονομή*

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

(*) Αναγνωρίζεται ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. ενσιρωμένες ζωοτροφές), δεν είναι δυνατόν να ληφθούν οι απαιτούμενες μερικές ποσότητες δείγματος χωρίς να προκληθεί απαράδεκτη ζημία στην παρτίδα. Στις περιπτώσεις αυτές επιτρέπεται η εφαρμογή εναλλακτικής μεθόδου δειγματοληψίας. Καθοδήγηση για τη δειγματοληψία παρτίδων αυτού του είδους έχει εκπονηθεί και είναι διαθέσιμη στη διεύθυνση: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf
(**) Όταν ο αριθμός που προκύπτει είναι κλασματικός, στρογγυλοποιείται προς τα άνω στον πλησιέστερο ακέραιο.

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

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

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

— έλεγχος της διασταυρούμενης μόλυνσης από συστατικό, συμπεριλαμβανομένων των γενετικώς τροποποιημένων υλικών, ή ουσία που αναμένεται να είναι ανομοιογενώς κατανεμημένη στις ζωοτροφές.

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

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

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

Στην περίπτωση των πολύ μεγάλων δειγματιζόμενων τμημάτων (άνω των 500 τόνων), αριθμός των προς λήψη μερικών ποσοτήτων δείγματος = 40 μερικές ποσότητες δείγματος + √ τόνοι, για τον έλεγχο ουσιών ή προϊόντων που είναι ομοιογενώς κατανεμημένα σε ολόκληρη τη ζωοτροφή, ή = 100 μερικές ποσότητες δείγματος + √ τόνοι, για τον έλεγχο συστατικών ή ουσιών που ενδέχεται να είναι ανομοιογενώς κατανεμημένα στις ζωοτροφές.

6. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Απαιτείται μόνο ένα συνολικό δείγμα ανά δειγματιζόμενο τμήμα.

	Είδος ζωοτροφών	Ελάχιστο μέγεθος συνολικού δείγματος (*) (**)
6.1.	Ασυσκεύαστες ζωοτροφές	4 kg
6.2.	Συσκευασμένες ζωοτροφές:	4 kg (***)
6.3.	Υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές:	4 λίτρα
6.4.	Κτηνοτροφικές πλάκες ή πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων:	
6.4.1.	βάρους άνω του 1 kg η καθεμία	4 kg
6.4.2.	βάρους έως 1 kg η καθεμία	το βάρος 4 αρχικών κτηνοτροφικών πλακών ή πλακών λείξης
6.5.	Χορτονομή	4 kg (****)

(*) Στην περίπτωση των υψηλής αξίας ζωοτροφών, μπορεί να ληφθεί μικρότερη ποσότητα συνολικού δείγματος, υπό τον όρο ότι αυτό περιγράφεται και τεκμηριώνεται στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

(**) Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011 της Επιτροπής, της 24ης Ιουνίου 2011, για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών, όσον αφορά την παρουσία γενετικώς τροποποιημένου υλικού για το οποίο εκκρεμεί διαδικασία έγκρισης ή του οποίου η έγκριση έχει λήξει (ΕΕ L 166 της 25.6.2011, σ. 9), το συνολικό δείγμα για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 35 000 σπέρματα/σπόρους. Αυτό συνεπάγεται ότι το μέγεθος του συνολικού δείγματος για τον αραβόσιτο πρέπει να είναι τουλάχιστον 10,5 kg και για τη σόγια 7 kg. Για άλλα σπέρματα και σπόρους, όπως το κριθάρι, το κεχρί, η βρώμη, το ρύζι, η σίκαλη, το σιτάρι και η κράμβη, τα 4 kg συνολικού δείγματος αντιστοιχούν σε πάνω από 35 000 σπέρματα/σπόρους.

(***) Στην περίπτωση των συσκευασμένων ζωοτροφών μπορεί επίσης να μην είναι δυνατόν να επιτευχθεί το μέγεθος συνολικού δείγματος των 4 kg, ανάλογα με το μέγεθος των επιμέρους μονάδων.

(****) Για χορτονομή χαμηλού ειδικού βάρους (π.χ. σανός, άχυρο), το ελάχιστο μέγεθος του συνολικού δείγματος θα πρέπει να είναι 1 kg.

7. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΑ ΤΕΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τελικά δείγματα

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

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

(*) Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011 της Επιτροπής, το τελικό δείγμα για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 10 000 σπέρματα/σπόρους. Αυτό συνεπάγεται ότι το μέγεθος του τελικού δείγματος για τον αραβόσιτο πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 000 g και για τη σόγια 2 000 g. Για άλλα σπέρματα και σπόρους, όπως το κριθάρι, το κεχρί, η βρώμη, το ρύζι, η σίκαλη, το σιτάρι και η κράμβη, τα 500 g τελικού δείγματος αντιστοιχούν σε πάνω από 10 000 σπέρματα.

(**) Εάν το μέγεθος του συνολικού δείγματος είναι σημαντικά μικρότερο από 4 kg ή λίτρα (βλέπε υποσημειώσεις του σημείου 6), μπορεί και στην περίπτωση αυτή να ληφθεί μικρότερη ποσότητα τελικού δείγματος, υπό τον όρο ότι αυτό περιγράφεται και τεκμηριώνεται στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

(***) Για τη δειγματοληψία οσπρίων, σπόρων σιτηρών και καρπών με κέλυφος με σκοπό τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, το ελάχιστο μέγεθος του τελικού δείγματος είναι 1 kg, σύμφωνα με την οδηγία 2002/63/ΕΚ της Επιτροπής, της 11ης Ιουλίου 2002, για την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μέσα και πάνω σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης και την κατάργηση της οδηγίας 79/700/ΕΟΚ (ΕΕ L 187 της 16.7.2002, σ. 30).

(****) Σε περίπτωση οπτικής εξέτασης ή μικροσκοπικής εξέτασης, η ποσότητα του τελικού δείγματος προς εξέταση είναι 1 kg.

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

8.1. **Γενικές αρχές**

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

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

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

8.2. **Μεγάλες παρτίδες μεταφερόμενες με πλοία**

8.2.1. *Δυναμική δειγματοληψία μεγάλων παρτίδων που μεταφέρονται με πλοία*

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

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

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

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

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

8.2.2. *Στατική δειγματοληψία παρτίδων που μεταφέρονται με πλοία*

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

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

8.3. **Δειγματοληψία μεγάλων παρτίδων σε αποθήκες**

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

8.4. **Δειγματοληψία σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης (σιλό)**

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

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

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

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

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

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

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

8.5. **Δειγματοληψία ασυσκεύαστων ζωοτροφών σε μεγάλα κλειστά εμπορευματοκιβώτια**

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

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

9.1. **Γενικά**

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

9.2. **Μερικές ποσότητες δείγματος**

Οι μερικές ποσότητες δείγματος πρέπει να λαμβάνονται τυχαία από το σύνολο του δειγματιζόμενου τμήματος, να είναι περίπου ισομεγέθεις και ομοιόμορφα κατανεμημένες.

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

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

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

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

Στην περίπτωση των δειγμάτων πώλησης εξ αποστάσεως, το μέγεθος της μερικής ποσότητας δείγματος εξαρτάται από το μέγεθος της μονάδας και μπορεί επίσης να περιέχει λιγότερο από 100 g ή 100 ml σε μεμονωμένες περιπτώσεις.

9.2.1. *Ασυσκεύαστες ζωοτροφές*

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

9.2.2. *Συσκευασμένες ζωοτροφές*

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

9.2.3. *Ομοιογενείς ή ομογενοποιήσιμες υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές*

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

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

9.2.4. *Μη ομογενοποιήσιμες υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές*

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

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

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

9.2.5. *Κτηνοτροφικές πλάκες και πλάκες λείξης ανόργανων αλάτων*

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

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

9.3. **Παρασκευή των συνολικών δειγμάτων**

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

9.4. **Παρασκευή των τελικών δειγμάτων**

Το υλικό του συνολικού δείγματος αναμειγνύεται επιμελώς ([2]).

([2]) Τυχόν σβώλοι θραύονται (εάν χρειάζεται, αποχωρίζονται από το δείγμα και ενσωματώνονται πάλι σε αυτό).

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

9.4.1. *Ομοιογενώς κατανεμημένες ουσίες*

Για τον έλεγχο συστατικών ή ουσιών που είναι ομοιογενώς κατανεμημένα σε ολόκληρη τη ζωοτροφή, το συνολικό δείγμα μπορεί να μειωθεί με αντιπροσωπευτικό τρόπο σε 2 kg ή 2 λίτρα τουλάχιστον (μειωμένο δείγμα) ([3]), κατά προτίμηση με μηχανικό ή αυτόματο διαιρέτη. Για τον έλεγχο της παρουσίας υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε όσπρια, σπόρους σιτηρών και καρπούς με κέλυφος, το ελάχιστο μέγεθος του μειωμένου δείγματος είναι 3 kg. Εάν το είδος της ζωοτροφής δεν επιτρέπει τη χρήση διαιρέτη ή εάν δεν υπάρχει διαιρέτης, το δείγμα μπορεί να μειωθεί με τη μέθοδο της διαίρεσης σε τέταρτα (να τεταρτιαστεί).

Στη συνέχεια, από το συνολικό δείγμα ή τα μειωμένα δείγματα λαμβάνονται τα τελικά δείγματα (για τον έλεγχο, ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς), των οποίων η ποσότητα είναι περίπου ίδια και τα οποία ανταποκρίνονται στις ποσοτικές απαιτήσεις του σημείου 7.

9.4.2. *Ανομοιογενώς κατανεμημένες ουσίες*

Για τον έλεγχο συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των γενετικώς τροποποιημένων υλικών, ή ουσιών που ενδέχεται να είναι ανομοιογενώς κατανεμημένα στις ζωοτροφές, το συνολικό δείγμα:

(i) ομογενοποιείται πλήρως. Στη συνέχεια, από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα λαμβάνονται τα τελικά δείγματα (για τον έλεγχο, ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς), των οποίων η ποσότητα είναι περίπου ίδια και τα οποία ανταποκρίνονται στις ποσοτικές απαιτήσεις του σημείου 7· ή

(ii) μειώνεται σε 2 kg ή 2 λίτρα ([4]), τουλάχιστον, με μηχανικό ή αυτόματο διαιρέτη. Μόνον εφόσον το είδος της ζωοτροφής δεν επιτρέπει τη χρήση διαιρέτη, μπορεί το δείγμα να μειωθεί, εάν είναι απαραίτητο, με τη μέθοδο της διαίρεσης σε τέταρτα. Για τον έλεγχο της παρουσίας γενετικώς τροποποιημένου υλικού στο πλαίσιο του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 619/2011, το μειωμένο δείγμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 35 000 σπέρματα/σπόρους ώστε να είναι δυνατόν να ληφθούν τελικά δείγματα για την επιβολή της νομοθεσίας, ως μέσο άμυνας και ως δείγματα αναφοράς που να περιέχουν τουλάχιστον 10 000 σπέρματα/σπόρους [βλέπε υποσημείωση (**) στο σημείο 6 και υποσημείωση (*) στο σημείο 7].

Στη συνέχεια, από το μειωμένο δείγμα παρασκευάζονται τα τελικά δείγματα, των οποίων η ποσότητα είναι περίπου ίδια και τα οποία ανταποκρίνονται στις ποσοτικές απαιτήσεις του σημείου 7.

9.5. **Συσκευασία των δειγμάτων**

Οι περιέκτες ή οι συσκευασίες σφραγίζονται και επισημαίνονται κατά τρόπο ώστε να είναι αδύνατον να ανοιχθούν χωρίς να καταστραφεί η σφραγίδα. Η ετικέτα πρέπει να είναι εξολοκλήρου ενσωματωμένη στη σφραγίδα. Εναλλακτικά, επιτρέπεται η τοποθέτηση του δείγματος σε περιέκτη που να μπορεί να πωματιστεί κατά τρόπο ώστε να μην είναι δυνατόν να ανοιχθεί χωρίς ανεπανόρθωτη βλάβη του περιέκτη, ο οποίος δεν πρέπει να επαναχρησιμοποιείται.

9.6. **Αποστολή των δειγμάτων στο εργαστήριο**

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

10. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

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

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

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

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

11. ΔΕΙΓΜΑ ΠΩΛΗΣΗΣ ΕΞ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΣ

— Για δείγμα πώλησης εξ αποστάσεως, η αρμόδια αρχή ζητά τις ζωοτροφές από την επιχείρηση ζωοτροφών μέσω τεχνικών εξ αποστάσεως επικοινωνίας. Στην περίπτωση αυτή, όταν ζητά τη ζωοτροφές, η αρμόδια αρχή δεν χρειάζεται να ταυτοποιείται με επίσημη ταυτότητα του υπευθύνου επιχείρησης ζωοτροφών και μπορεί να χρησιμοποιεί καλυμμένη ταυτότητα.

— Το συνολικό δείγμα και τα τελικά δείγματα του δείγματος πώλησης εξ αποστάσεως πρέπει να λαμβάνονται αμέσως μετά την παραλαβή του φορτίου από πρόσωπα εξουσιοδοτημένα για τον σκοπό αυτόν. Για την παραγωγή του συνολικού δείγματος, πρέπει να λαμβάνεται κατάλληλος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων τυχαία και ομοιόμορφα κατανεμημένα από τη συνολική ποσότητα που λαμβάνεται και να αναμειγνύονται/ομογενοποιούνται επιμελώς, σύμφωνα, στο μέτρο του δυνατού, με τις αρχές που ορίζονται στα σημεία 5, 9.2 και 9.3. Εάν η ζωοτροφή είναι συσκευασμένη σε μεμονωμένες μονάδες, πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον 4 μονάδες από τις οποίες πρέπει να λαμβάνεται τουλάχιστον ένα στοιχειώδες δείγμα. Εάν αποδειχθεί κατά περίπτωση ότι οι λαμβανόμενες μονάδες προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες, ο αριθμός των μονάδων που πρέπει να αποτελέσουν αντικείμενο δειγματοληψίας πρέπει να μειωθεί και να περιοριστεί στις μονάδες που προέρχονται από την ίδια παρτίδα. Σε περίπτωση ανάλυσης του εξ αποστάσεως πωλούμενου δείγματος για συστατικά ή ουσίες που δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στις ζωοτροφές, ο αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων πρέπει να είναι τουλάχιστον 2,5 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονται σε ουσίες ομοιόμορφα κατανεμημένες σε όλη τη ζωοτροφή.

Στη συνέχεια, από το συνολικό δείγμα λαμβάνονται τα αντίστοιχα τελικά δείγματα (για έλεγχο, ως μέσο άμυνας και, ενδεχομένως, αναφοράς) σύμφωνα, στο μέτρο του δυνατού, με τις αρχές που ορίζονται στο σημείο 9.4 και το αρχείο δειγματοληψίας δείχνει ότι πρόκειται για δείγμα εξ αποστάσεως πώλησης. Στη συνέχεια, η αρμόδια αρχή ενημερώνει αμέσως τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για τη δειγματοληψία. Ο υπεύθυνος επιχείρησης ζωοτροφών ενημερώνεται επίσης ότι ένα δείγμα (για λόγους άμυνας) διατηρείται, όταν είναι δυνατόν, στη διάθεσή του από την αρμόδια αρχή, σε συγκεκριμένη τοποθεσία, για αμυντικούς σκοπούς ή αποστέλλεται στον υπεύθυνο επιχείρησης ζωοτροφών ή αποστέλλεται στο εργαστήριο που έχει οριστεί από τον υπεύθυνο επιχείρησης ζωοτροφών σύμφωνα με τους ισχύοντες εθνικούς κανόνες.

Εάν το δείγμα αποστέλλεται απευθείας στο επίσημο εργαστήριο, το τελικό δείγμα πρέπει να παρασκευάζεται και να σφραγίζεται στο εργαστήριο από εξουσιοδοτημένα για το σκοπό αυτό πρόσωπα ή παρουσία εξουσιοδοτημένων για τον σκοπό αυτόν προσώπων. Το αρχείο δειγματοληψίας του δείγματος εξ αποστάσεως πώλησης πρέπει να αποστέλλεται αμέσως μετά τον σχηματισμό των τελικών δειγμάτων στην αρμόδια αρχή, η οποία ενημερώνει τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για τη δειγματοληψία.

Θεωρείται ότι η ποσότητα που προμηθεύει ο υπεύθυνος της επιχείρησης ζωοτροφών στην αρμόδια αρχή αντιπροσωπεύει μέρος παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής. Σύμφωνα με το άρθρο 15 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ([5]), σε περίπτωση δειγματοληψίας μέρους μιας παρτίδας ζωοτροφών της ίδιας κατηγορίας ή περιγραφής και εάν το εν λόγω μέρος της παρτίδας διαπιστωθεί ότι δεν πληροί τις ενωσιακές απαιτήσεις, θεωρείται ότι θίγεται το σύνολο των ζωοτροφών της συγκεκριμένης παρτίδας, εκτός εάν από διεξοδική εξέταση δεν προκύψουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι η υπόλοιπη παρτίδα δεν πληροί τις απαιτήσεις της ΕΕ.»

([5]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 28ης Ιανουαρίου 2002, για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων (ΕΕ L 31 της 1.2.2002, σ. 1).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Α. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. **Σκοπός**

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

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

Εκτός από τις διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν παράρτημα, ακολουθούνται οι κατευθυντήριες γραμμές για την προετοιμασία των δειγμάτων που προβλέπονται στο πρότυπο EN ISO 6498.

2. **Απαραίτητες προφυλάξεις**

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

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

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

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

Η ομογενοποίηση του δείγματος με την παρασκευή μείγματος με ανάμειξη μεγάλης διάτμησης με νερό έχει αποδειχθεί ότι παρέχει σε ορισμένες περιπτώσεις πιο ομοιογενή επιμέρους δείγματα από ό,τι η ξηρή ομογενοποίηση/άλεση, ιδίως στην περίπτωση χημικών ουσιών ανομοιογενούς κατανομής. Ωστόσο, και η ομογενοποίηση με επαρκή ξηρή άλεση μπορεί να παρέχει ομοιογενή επιμέρους δείγματα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για τον προσδιορισμό των εργοτίων της σίκαλης, των επιβλαβών βοτανικών προσμείξεων κ.λπ., η ομογενοποίηση του δείγματος δεν μπορεί να γίνει με άλεση, παρά με επαρκή ανάμειξη του δείγματος.

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

3. **Διαδικασία**

3.1. *Γενική διαδικασία*

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

3.1.1. Ζωοτροφές που μπορούν να κονιοποιηθούν ως έχουν

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

3.1.2. Ζωοτροφές που μπορούν να κονιοποιηθούν μετά από ξήρανση

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

3.1.3. Υγρές ή ημίρρευστες ζωοτροφές

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

3.1.4. Λοιπές ζωοτροφές

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

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

— Σε περίπτωση οπτικής εξέτασης (χωρίς τη χρήση μικροσκοπίου), χρησιμοποιείται για την εξέταση ολόκληρο το συνολικό ή τελικό δείγμα.

— Σε περίπτωση μικροσκοπικής εξέτασης, το εργαστήριο μπορεί να μειώνει το συνολικό δείγμα ή να μειώνει περαιτέρω το μειωμένο δείγμα. Τα τελικά δείγματα ως μέσο άμυνας και πιθανώς ως δείγματα αναφοράς λαμβάνονται με διαδικασία ισοδύναμη με εκείνη που ακολουθείται όσον αφορά το τελικό δείγμα για την επιβολή της νομοθεσίας.

— Σε περίπτωση ομογενοποίησης ολόκληρου του συνολικού δείγματος, τα τελικά δείγματα λαμβάνονται από το ομογενοποιημένο συνολικό δείγμα.

— Για τον προσδιορισμό των εργοτίων της σίκαλης και των επιβλαβών βοτανικών προσμείξεων, το τελικό δείγμα πρέπει να διαιρεθεί σε 2 επιμέρους δείγματα ίσου βάρους περίπου 500 γραμμαρίων. Εξετάζεται ένα μερικό δείγμα. Αν το αποτέλεσμα των μερικών δειγμάτων είναι ίσο ή μικρότερο του 50 % (κατώφλιο αναλυτικού προσδιορισμού) του ανώτατου επιπέδου, το δείγμα συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο. Αν το αποτέλεσμα είναι μεγαλύτερο από το 50 % του ανώτατου επιπέδου, πρέπει να εξεταστεί και άλλο μερικό δείγμα και να χρησιμοποιηθεί ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των 2 μερικών δειγμάτων για τον έλεγχο της συμμόρφωσης με το ανώτατο επίπεδο.

4. **Φύλαξη των δειγμάτων**

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

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

1. Εκτός αντίθετης διάταξης των αναλυτικών μεθόδων, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας (pro analysis/p.a.). Για την ανάλυση των ιχνοστοιχείων, η καθαρότητα των αντιδραστηρίων πρέπει να ελέγχεται με τυφλό πείραμα. Ανάλογα με το λαμβανόμενο αποτέλεσμα, ενδέχεται να απαιτείται επιπλέον καθαρισμός των αντιδραστηρίων.

2. Όταν στις αναλυτικές μεθόδους αναφέρονται εργασίες παρασκευής διαλυμάτων, αραίωσης, έκπλυσης ή πλύσης, χωρίς ένδειξη για το είδος του διαλύτη ή αραιωτικού μέσου, εννοείται ότι πρέπει να χρησιμοποιείται νερό. Κατά κανόνα, το νερό πρέπει να είναι απιονισμένο ή απεσταγμένο. Σε ειδικές περιπτώσεις, που επισημαίνονται στις μεθόδους ανάλυσης, το νερό πρέπει να υποβάλλεται σε ειδικές μεθόδους καθαρισμού.

3. Λαμβανομένου υπόψη του συνήθους εξοπλισμού των εργαστηρίων ελέγχου, στις μεθόδους ανάλυσης αναφέρονται μόνο τα ειδικά όργανα και συσκευές ή εκείνα που απαιτούν συγκεκριμένο τρόπο χρήσης. Ο εξοπλισμός αυτός πρέπει να είναι καθαρός, ιδίως σε περίπτωση προσδιορισμού πολύ μικρών ποσοτήτων ουσιών.

Γ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. **Διαδικασία εκχύλισης**

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

2. **Διαδικασία καθαρισμού**

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

3. **Αριθμός προσδιορισμών**

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

Στην περίπτωση ελέγχου ελάχιστων ή μέγιστων επιπέδων πρόσθετων υλών ζωοτροφών, εάν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού είναι υψηλότερα από το ελάχιστο επίπεδο ή κάτω από το μέγιστο επίπεδο, δεν απαιτούνται πρόσθετοι προσδιορισμοί, υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας. Σε άλλες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ανάλυση εις διπλούν (δεύτερος προσδιορισμός) για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή συμπτωματικής ανάμειξης δειγμάτων. Ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών χρησιμοποιείται για περαιτέρω αξιολόγηση.

Στην περίπτωση του ελέγχου της δηλούμενης περιεκτικότητας σε ουσία ή συστατικό, εάν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού επιβεβαιώνει τη δηλούμενη περιεκτικότητα, δηλαδή το αναλυτικό αποτέλεσμα περικλείεται στο αποδεκτό εύρος μεταβλητότητας της δηλούμενης περιεκτικότητας, δεν απαιτούνται πρόσθετοι προσδιορισμοί, υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας. Σε άλλες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ανάλυση εις διπλούν (δεύτερος προσδιορισμός) για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή συμπτωματικής ανάμειξης δειγμάτων. Ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών χρησιμοποιείται για περαιτέρω αξιολόγηση (το μέσο αποτέλεσμα της ανάλυσης εμπίπτει ή όχι στο αποδεκτό εύρος διακύμανσης της δηλούμενης περιεκτικότητας).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό το αποδεκτό εύρος διακύμανσης ορίζεται στη νομοθεσία, όπως στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 767/2009 και στον κανονισμό (ΕΕ) 2019/4 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ([1]).

4. **Αναφορά της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου**

Στη έκθεση ανάλυσης αναφέρεται η χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος.

5. **Αναφορά των αναλυτικών αποτελεσμάτων**

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

Τα περισσότερα κανονιστικά επίπεδα (π.χ. μέγιστο επίπεδο, ελάχιστο επίπεδο) στη νομοθεσία της ΕΕ για τις ζωοτροφές καθορίζονται σε σχέση με ζωοτροφές με περιεκτικότητα σε υγρασία 12 %. Ως εκ τούτου, στις περιπτώσεις αυτές, προκειμένου να εκτιμηθεί το αναλυτικό αποτέλεσμα που μετρήθηκε στο δείγμα σε σχέση με το κανονιστικό επίπεδο, το αναλυτικό αποτέλεσμα πρέπει πρώτα να διαιρεθεί με την περιεκτικότητα του δείγματος σε ξηρά ουσία (σε %) και να πολλαπλασιαστεί επί 88, όπως αναφέρεται στον ακόλουθο τύπο:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

όπου:

Mc: ποσοστό υγρασίας του δείγματος (%). 100 − Mc επομένως, αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα του δείγματος σε ξηρά ουσία (%).

R_{ana}: αναλυτικό αποτέλεσμα όπως μετρήθηκε στο δείγμα

$R_{12\,\%}$: αποτέλεσμα για ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %·να αξιολογηθεί σε σχέση με το κανονιστικό επίπεδο.

([1]) Κανονισμός (ΕΕ) 2019/4 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 11ης Δεκεμβρίου 2018, σχετικά με την παρασκευή, τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση φαρμακούχων ζωοτροφών, την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 183/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου και την κατάργηση της οδηγίας 90/167/ΕΟΚ του Συμβουλίου (ΕΕ L 4 της 7.1.2019, σ. 1).

Επιπλέον, εφόσον πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

— το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι σημαντικά (> 50 %) χαμηλότερο ή υψηλότερο από τις πληροφορίες/προδιαγραφές επισήμανσης προς έλεγχο (ανάλογα με το αν οι πληροφορίες/προδιαγραφές επισήμανσης αποτελούν το μέγιστο ή ελάχιστο επίπεδο)·

— η περιεκτικότητα σε υγρασία της δειγματιζόμενης ζωοτροφής είναι γνωστή και μπορεί να προσδιοριστεί ότι η διόρθωση της περιεκτικότητας σε υγρασία δεν θα μεταβάλει την εκτίμηση,

τότε, υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας και ότι η ανάλυση εξυπηρετεί μόνο τον σκοπό του ελέγχου της συμμόρφωσης με τις νομικές διατάξεις, η διόρθωση της περιεκτικότητας σε υγρασία μπορεί να παραλείπεται (π.χ. σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει προδιαγραφή ή κανονιστικό επίπεδο), εκτός εάν αυτό απαιτείται για λόγους ερμηνείας.

Εάν το αποτέλεσμα της ανάλυσης διορθωθεί ως προς την περιεκτικότητα σε υγρασία, η αντίστοιχη αβεβαιότητα μέτρησης πρέπει επίσης να διορθωθεί με την ίδια διαδικασία.

Σε περίπτωση προσδιορισμού των εργοτίων της σίκαλης ή επιβλαβών βοτανικών προσμείξεων με οπτική/μικροσκοπική εξέταση, δεν είναι απαραίτητη η διόρθωση της περιεκτικότητας σε υγρασία.

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

Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ουσίες, κατά την έννοια της οδηγίας 2002/32/ΕΚ, ένα προϊόν που προορίζεται για ζωοτροφή θεωρείται ότι δεν συμμορφώνεται με την καθορισμένη μέγιστη περιεκτικότητα, εάν κριθεί ότι το αναλυτικό αποτέλεσμα, ως μέσος όρος δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών, σε σχέση με ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %, υπερβαίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα, λαμβανομένων υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης που υπολογίζεται με τη χρήση συντελεστή κάλυψης ίσου με 2, ο οποίος παρέχει διάστημα εμπιστοσύνης περίπου 95 %, και της διόρθωσης ως προς την ανάκτηση. Αυτό σημαίνει, ότι για την εκτίμηση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά από διόρθωση ως προς την ανάκτηση και αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται μόνο σε περιπτώσεις όπου η μέθοδος ανάλυσης επιτρέπει την εκτίμηση της διευρυμένης αβεβαιότητας της αναλυτικής μέτρησης και της διόρθωσης για ανάκτηση. (π.χ. δεν απαιτείται σε περίπτωση οπτικής/μικροσκοπικής εξέτασης).

Εάν το αναλυτικό αποτέλεσμα του δείγματος που ελήφθη ως μέσο άμυνας υπερβαίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα (χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η διευρυμένη αβεβαιότητα της αναλυτικής μέτρησης), αυτό επιβεβαιώνει τη μη συμμόρφωση που διαπιστώθηκε με το δείγμα ελέγχου, ελλείψει ειδικών εθνικών κανόνων για το θέμα αυτό.

Το αναλυτικό αποτέλεσμα αναφέρεται ως εξής (στον βαθμό που η χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος επιτρέπει την εκτίμηση της διευρυμένης αβεβαιότητας αναλυτικής μέτρησης):

α) διορθωμένο ως προς την ανάκτηση, κατά περίπτωση, και όταν διορθώνεται αυτό πρέπει να δηλώνεται με αυτόν τον τρόπο. Αναφέρεται το ποσοστό ανάκτησης, εκτός εάν η εγγενής διόρθωση για τη μεροληψία αποτελεί μέρος της διαδικασίας, όπου μεροληψία είναι η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης τιμής και της συγκέντρωσης αναφοράς. Η διόρθωση για ανάκτηση δεν είναι απαραίτητη εάν το ποσοστό ανάκτησης κυμαίνεται μεταξύ 90 και 110 %.

β) ως «x +/– U», όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα αναλυτικής μέτρησης, με τη χρήση παράγοντα κάλυψης 2 ([2]) που παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.

Ωστόσο, εάν το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι σημαντικά μικρότερο (> 50 %) από την προς έλεγχο προδιαγραφή, και υπό τον όρο ότι εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες ποιότητας και η ανάλυση χρησιμοποιείται με αποκλειστικό σκοπό τον έλεγχο της συμμόρφωσης προς τις νομοθετικές διατάξεις, η αναφορά του ποσοστού ανάκτησης και η διευρυμένη αβεβαιότητα της αναλυτικής μέτρησης μπορεί να παραλείπονται (π.χ. σε περιπτώσεις που δεν υπάρχει προδιαγραφές ή κανονιστικό επίπεδο), εκτός εάν η αβεβαιότητα μέτρησης είναι απαραίτητη για την ερμηνεία.

7. Αβεβαιότητα αναλυτικής μέτρησης και ποσοστό ανάκτησης στην περίπτωση της ανάλυσης περιεκτικότητας σε πρόσθετες ύλες ζωοτροφών

Για να ελεγχθεί η συμμόρφωση με την επιτρεπόμενη ελάχιστη και μέγιστη περιεκτικότητα σε πρόσθετες ύλες ζωοτροφών, η παρουσία μιας πρόσθετης ύλης ζωοτροφών θεωρείται ότι δεν συμμορφώνεται με την καθορισμένη ελάχιστη και μέγιστη περιεκτικότητα, εάν το αναλυτικό αποτέλεσμα ως μέσος όρος δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών, σε σχέση με ζωοτροφή με περιεκτικότητα σε υγρασία 12 %, θεωρείται ότι:

([2]) Το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας άλλο παράγοντα, όπως ο παράγοντας t.

— υπερβαίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας της αναλυτικής μέτρησης και της διόρθωσης για ανάκτηση. Αυτό σημαίνει, ότι για την εκτίμηση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση (δηλαδή ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών), μετά από διόρθωση ως προς την ανάκτηση και αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

— υπολείπεται της ελάχιστης περιεκτικότητας, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας της αναλυτικής μέτρησης και της διόρθωσης για ανάκτηση. Αυτό σημαίνει, ότι για την εκτίμηση της συμμόρφωσης χρησιμοποιείται η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση (δηλαδή ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών), μετά από διόρθωση ως προς την ανάκτηση και πρόσθεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

Εάν το αναλυτικό αποτέλεσμα του δείγματος που ελήφθη ως μέσο άμυνας υπερβαίνει τη μέγιστη περιεκτικότητα (χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η διευρυμένη αβεβαιότητα της αναλυτικής μέτρησης), αυτό επιβεβαιώνει τη μη συμμόρφωση που διαπιστώθηκε με το δείγμα ελέγχου, ελλείψει ειδικών εθνικών κανόνων για το θέμα αυτό.

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

α) διορθωμένο ως προς την ανάκτηση, κατά περίπτωση, και όταν διορθώνεται αυτό πρέπει να δηλώνεται με αυτόν τον τρόπο. Αναφέρεται το ποσοστό ανάκτησης, εκτός εάν η εγγενής διόρθωση για τη μεροληψία αποτελεί μέρος της διαδικασίας, όπου μεροληψία είναι η διαφορά μεταξύ της μετρούμενης τιμής και της συγκέντρωσης αναφοράς. Η διόρθωση για ανάκτηση δεν είναι απαραίτητη εάν το ποσοστό ανάκτησης κυμαίνεται μεταξύ 90 και 110 %.

β) ως «x +/– U», όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης (μέσος όρος των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών) και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα αναλυτικής μέτρησης, με τη χρήση παράγοντα κάλυψης 2 ([3]) που παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.».

([3]) Το διάστημα εμπιστοσύνης 95 % μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας άλλο παράγοντα, όπως ο παράγοντας t.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

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

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

Η μέθοδος δεν αφορά την ανάλυση των γαλακτοκομικών προϊόντων ως πρώτων υλών ζωοτροφών και σύνθετων ζωοτροφών, που αποτελούνται κυρίως από γαλακτοκομικών προϊόντα, την ανάλυση ζωικών και φυτικών λιπών και ελαίων, καθώς και την ανάλυση των ελαιούχων σπόρων και καρπών.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ελαιούχων σπόρων σε υγρασία καθορίζεται με τη μέθοδο που προβλέπεται στο πρότυπο EN ISO 665 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε υγρασία και πτητικές ουσίες, με την προϋπόθεση ότι οι σπόροι σόγιας πρέπει να αλεστούν πριν από τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε υγρασία.

2. **Αρχή**

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

3. **Όργανα**

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

3.2. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 1 mg.

3.3. Στεγνά μεταλλικά δοχεία από ανοξείδωτο μέταλλο ή από γυαλί, εφοδιασμένα με κάλυμμα το οποίο εξασφαλίζει αεροστεγές κλείσιμο. Ωφέλιμη επιφάνεια που επιτρέπει την κατανομή της ποσότητας του δείγματος σε αναλογία 0,3 g ανά cm^2 περίπου.

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

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

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

4. **Διαδικασία**

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

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

4.1. *Προετοιμασία*

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

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

4.1.2. Σιτηρά και χονδράλευρα

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

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

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

4.2. *Αποξήρανση*

Ξηραίνεται ένας περιέκτης (σημείο 3.3) με το κάλυμμά του στον κλίβανο ο οποίος είναι ρυθμισμένος στους 103 °C για 30 λεπτά ± 1 λεπτά. Εξάγεται από τον κλίβανο και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εντός του αποξηραντήρα (σημείο 3.6).

4.2.1. Ζωοτροφές εκτός από εκείνες που εμπίπτουν στα σημεία 4.2.2 και 4.2.3

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

Στην περίπτωση κατά την οποία οι ζωοτροφές συνίστανται ουσιωδώς (> 50 %) σε έλαια και λίπη ζωικής και φυτικής προέλευσης διενεργείται συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών μέσα στον κλίβανο αποξήρανσης στους 103 °C. Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % της υγρασίας.

4.2.2. Σιτηρά, άλευρα, χονδράλευρα και σιμιγδάλια

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

4.2.3. Σύνθετες ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο του 4 % σακχαρόζη ή λακτόζη:πρώτες ύλες ζωοτροφών όπως χαρούπια, αφυδατωμένα προϊόντα σιτηρών, φύτρα βύνης, λοβοί τεύτλων, διαλυτοί ιχθείς και ζάχαρη

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

Επιφέρεται πίεση 100 Torr και αφήνεται να ξηρανθεί στην πίεση αυτή επί τέσσερις ώρες, είτε σε ξηρό και θερμό ρεύμα αέρος, είτε με τη χρήση αφυδατικού μέσου (300 g περίπου για 20 δείγματα). Στην τελευταία περίπτωση διακόπτεται η σύνδεση με την αντλία κενού όταν επιτευχθεί η ως άνω πίεση. Η διάρκεια ξήρανσης μετράται από τη στιγμή κατά την οποία η θερμοκρασία του κλιβάνου έχει επανέλθει στους 80 °C έως 85 °C. Ο κλίβανος επαναφέρεται στη συνέχεια με προσοχή σε ατμοσφαιρική πίεση. Ο κλίβανος ανοίγεται, επανατοποθετείται αμέσως το κάλυμμα στο δοχείο, εξάγεται το δοχείο από τον κλίβανο, αφήνεται να ψυχθεί επί 30 έως 45 λεπτά εντός του αποξηραντήρα (σημείο 3.6) και ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg. Διενεργείται συμπληρωματική ξήρανση 30 λεπτών μέσα στον κλίβανο κενού σε θερμοκρασία 80 °C έως 85 °C και ζυγίζεται εκ νέου. Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % της υγρασίας.

4.3. *Προκαταρκτική (μερική) ξήρανση*

Είναι αναγκαίο να ξηραίνονται μερικώς ζωοτροφές «που έχουν διαβραχεί» με κλάσμα μάζας μικρότερο από 85 % ξηράς ουσίας [π.χ. χορτονομές, ολικά αναμεμειγμένα σιτηρέσια, (μη) υγρές ζωοτροφές] πριν από τη λεπτή άλεση, προκειμένου να αναλυθούν οι σταθερές ουσίες τους για ασταθείς ουσίες, δεν είναι δυνατή η μερική ξήρανση.

Η μερική ξήρανση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση κλιβάνου με εξαναγκασμένη κυκλοφορία αέρα ή με φούρνο μικροκυμάτων είτε με λυοφιλίωση. Με εξαίρεση τη μερική ξήρανση με λυοφιλίωση, στόχος είναι η ξήρανση της ζωοτροφής με διατήρηση της θερμοκρασίας του δείγματος κάτω από τους 60 °C, έτσι ώστε η χημική σύνθεση να επηρεάζεται ελάχιστα. Η ξήρανση σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 60 °C προκαλεί χημικές αλλαγές στη ζωοτροφή (π.χ. αποδόμηση πρωτεϊνών). Η αποξηραμένη ζωοτροφή πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά πριν από τη μέτρηση της μερικώς ξηράς ουσίας, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανή μεταβολή της υγρασίας που μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια της άλεσης και της αποθήκευσης. Η ξήρανση σε θερμοκρασίες κάτω των 60 °C δεν αφαιρεί όλο το νερό από τη ζωοτροφή· ως εκ τούτου, η (αρχική) μερική ξήρανση δεν αντιπροσωπεύει την ολική ξηρά ουσία της ζωοτροφής. Μετά την ξήρανση, το μερικό δείγμα αλέθεται και αναλύεται η (τελική) ξηρά ουσία του μερικώς ξηρού δείγματος (η απομένουσα περιεκτικότητα σε υγρασία είναι μεταξύ 3 % και 15 %) εφόσον έχουν προσδιοριστεί τα άλλα χημικά συστατικά.

Ως εκ τούτου, συνιστάται μια διαδικασία δύο σταδίων για τον προσδιορισμό της ξηράς ουσίας. Αρχικά προσδιορίζεται η μερική περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (εάν είναι κατώτερη του 85 % επί ξηράς ουσίας), στη συνέχεια προσδιορίζεται η εναπομένουσα περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία σε αλεσμένο δείγμα δοκιμής και πολλαπλασιάζεται η μερικώς ξηρά ουσία επί το εναπομένον ξηρό υπόλειμμα για τον προσδιορισμό της συνολικής ξηράς ουσίας.

5. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

5.1. *Αποξήρανση χωρίς προκαταρκτική ξήρανση*

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

όπου:

m = αρχικό βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος,

m_0 = βάρος σε γραμμάρια της ξηρανθείσας ποσότητας του δείγματος.

5.2. *Αποξήρανση με προκαταρτική ξήρανση* ([2])

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

όπου:

m = αρχικό βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος,

m_1 = βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος κατόπιν προκαταρκτικής ξήρανσης,

m_2 = βάρος σε γραμμάρια της ποσότητας του δείγματος κατόπιν κονιοποίησης ή άλεσης,

m_0 = βάρος σε γραμμάρια της ξηρανθείσας ποσότητας του δείγματος.

([2]) Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τον υπολογισμό, γίνεται αναφορά στο πρότυπο EN ISO 6498 — Ζωοτροφές — Κατευθυντήριες γραμμές για την προετοιμασία των δειγμάτων.

5.3. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν υπερβαίνει το 0,2 % της απόλυτης τιμής υγρασίας, με εξαίρεση τις υγρές τροφές για ζώα συντροφιάς και τα τεχνητά κόκαλα για σκύλους, όπου η διαφορά δεν υπερβαίνει το 0,5 % της απόλυτης τιμής υγρασίας.

6. **Παρατήρηση**

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

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

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

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

3. **'Οργανα**

3.1. Υποδοχέας (κάψα) επίπεδου πυθμένα από ανοξείδωτο υλικό, διαμέτρου 8 έως 9 cm και ύψους περίπου 3 cm.

3.2. Θερμόμετρο με ενισχυμένο βολβό και θάλαμο διαστολής στο άνω άκρο, διαβαθμισμένο μεταξύ 80 °C περίπου έως 110 °C τουλάχιστον και μήκους 10 cm περίπου.

3.3. Αμμόλουτρο ή θερμαινόμενη ηλεκτρική πλάκα.

3.4. Ξηραντήρας που περιέχει δραστικό αφυδατικό μέσο.

3.5. Αναλυτικός ζυγός.

4. **Διαδικασία**

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

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

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

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

5. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

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

όπου:

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

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

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

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

Επαναληψιμότητα

Η διαφορά της υγρασίας μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που έγιναν στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,1 % σε απόλυτη τιμή.

Γ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΟΛΙΚΕΣ ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών σε ολικές αζωτούχες ουσίες βάσει της περιεκτικότητας σε άζωτο, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη μέθοδο Kjeldahl ([3]).

2. **Αρχή**

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

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Θειικό κάλιο.

3.2. Καταλύτης: οξείδιο του (δισθενούς) χαλκού (CuO) ή θειικός χαλκός πεντάκις (δισθενής) ένυδρος $CuSO_4$ $5H_2O$.

3.3. Ψευδάργυρος υπό μορφή κόκκων.

3.4. Θειικό οξύ, $\rho 20$ = 1,84 g/ml.

3.5. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, c(H_2SO_4) = 0,25 mol/l.

3.6. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, c(H_2SO_4) = 0,10 mol/l.

3.7. Θειικό οξύ, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα, c(H_2SO_4) = 0,05 mol/l.

3.8. Δείκτης ερυθρό του μεθυλίου· διαλύονται 300 mg ερυθρού του μεθυλίου σε 100 ml αιθανόλης, σ = 95-96 % (v/v).

3.9. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα του εμπορίου για τεχνικές χρήσεις) β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10. Υδροξείδιο του νατρίου, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα c(NaOH) = 0,25 mol/l.

3.11. Υδροξείδιο του νατρίου, πρότυπο ογκομετρικό διάλυμα c(NaOH) = 0,10 mol/l.

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

3.13. Ακετανιλίδιο (σ.τ. = 114 °C, περιεκτικότητα αζώτου = 10,36 %).

3.14. Σακχαρόζη (ελεύθερη αζώτου).

3.15. Βορικό οξύ (H_3BO_3).

([3]) Η περιεκτικότητα σε N μπορεί να προσδιοριστεί σε όλες τις ζωοτροφές, αλλά ενδέχεται να μην εφαρμόζεται συντελεστής μετατροπής 6,25 για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας σε ολικές αζωτούχες ουσίες για πρώτες ύλες ζωοτροφών από έντομα (χαμηλότερος συντελεστής μετατροπής) και ορισμένες τροφές για ζώα συντροφιάς και πρωτεΐνες πλάσματος του αίματος (υψηλότερος συντελεστής μετατροπής).

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

3.17. Διάλυμα πράσινου της βρωμοκρεζόλης: διαλύονται 100 mg πράσινου της βρωμοκρεζόλης σε 100 ml αιθανόλης ή μεθανόλης.

3.18. Διάλυμα βορικού οξέος (συγκέντρωσης 10 g/l έως 40 g/l ανάλογα με τα όργανα που χρησιμοποιούνται)

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

Ανάλογα με την ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται, το pH του διαλύματος βορικού οξέος μπορεί να διαφέρει από παρτίδα σε παρτίδα. Το pH του διαλύματος βορικού οξέος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 4,3 και 4,7. Συχνά απαιτείται μια ρύθμιση με την προσθήκη μικρής ποσότητας αλκάλεως για να προκύψει ένα θετικό τυφλό δείγμα.

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

3.19. Υδροχλωρικό οξύ, πρότυπο διάλυμα, c(HCl) = 0,10 mol/l.

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

4. **Όργανα**

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

5. **Διαδικασία**

5.1. *Ανοργανοποίηση*

Ζυγίζουμε 1 g του δείγματος με ακρίβεια 0,001 g και το εισάγουμε στη φιάλη της συσκευής ανοργανοποίησης. Προσθέτουμε 15 g θειικού καλίου (σημείο 3.1), την ενδεδειγμένη ποσότητα καταλύτου (σημείο 3.2) (0,3 έως 0,4 g CuO ή 0,9 έως 1,2 g CuSO4-5H2O), 25 ml θειικού οξέος (σημείο 3.4) και, αν χρειάζεται**,** μερικούς κόκκους ελαφρόπετρας (σημείο 3.12) και αναμειγνύουμε.

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

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

5.2. *Απόσταξη*

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

5.2.1. Απόσταξη σε θειικό οξύ

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

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

5.2.2. Απόσταξη σε βορικό οξύ

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

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

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

5.3. *Ογκομέτρηση*

Συνεχίζουμε σύμφωνα με τα σημεία 5.3.1 ή 5.3.2.

5.3.1. Θειικό οξύ

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

5.3.2. Βορικό οξύ

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

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

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

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

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

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

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

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

5.4. *Τυφλό πείραμα*

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Οι υπολογισμοί εκτελούνται σύμφωνα με το σημείο 6.1. ή 6.2.

6.1. *Υπολογισμός για την ογκομέτρηση σύμφωνα με το σημείο 5.3.1*

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

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

όπου:

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

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

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

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

6.2. *Υπολογισμός για την ογκομέτρηση σύμφωνα με το σημείο 5.3.2*

6.2.1. Ογκομέτρηση με υδροχλωρικό οξύ

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

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

όπου:

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

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

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

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

6.2.2. Ογκομέτρηση με θειικό οξύ

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

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

όπου:

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

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

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

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

7. **Επαλήθευση της μεθόδου**

7.1. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει

— το 0,4 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα αζωτούχων ουσιών μικρότερα από 20 %,

— το 2,0 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για επίπεδα από 20 % έως 40 %,

— το 0,8 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα μεγαλύτερα από 40 %.

7.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα σε διαφορετικά εργαστήρια δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 1,8 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα αζωτούχων ουσιών μικρότερα από 20 %,

— το 9,0 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για επίπεδα από 20 % έως 40 %,

— το 3,6 % σε απόλυτη τιμή, για επίπεδα μεγαλύτερα από 40 %.

7.3. *Ακρίβεια της μεθόδου*

Η ανάλυση (ανοργανοποίηση, απόσταξη και ογκομέτρηση) διεξάγεται σε κατάλληλη ποσότητα ακετανιλιδίου (σημείο 3.13) (π.χ. 0,2 έως 0,3 g) παρουσία 1 g σακχαρόζης (σημείο 3.14)·για 1 g ακετανιλιδίου απαιτούνται 14,80 ml θειικού οξέος (σημείο 3.5). Η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 99 %.

8. **Παρατηρήσεις**

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

8.2. Εάν το προκύπτον από την ανοργανοποίηση υγρό πήγνυται, προβαίνουμε σε νέο προσδιορισμό χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη ποσότητα θειικού οξέος (σημείο 3.4) από την οριζόμενη στο σημείο 5.1.

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

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

Δ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΙΑΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ζωοτροφών για μηρυκαστικά σε ουρία που χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών.

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

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

3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ και 3 g κρυσταλλικού οξεικού οξέος. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.3. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου, $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

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

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

4. **Όργανα**

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

4.2. Δοκιμαστικοί σωλήνες: 160 × 16 mm με εσμυρισμένα πώματα.

4.3. Φασματοφωτόμετρο

5. **Διαδικασία**

5.1. *Ανάλυση του δείγματος*

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

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

5.2. *Πρότυπη καμπύλη*

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

Εκφράστε το αποτέλεσμα σε mg ουρίας ανά kg δείγματος.

7. **Αξιολόγηση της μεθόδου**

7.1. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα στο ίδιο εργαστήριο και από τον ίδιο χειριστή δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— Στα 420 nm

  — 50 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 3 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 5 000 mg/kg·

  — 25 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 5 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 7 000 mg/kg·

  — 20 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητα σε ουρία άνω των 7 000 mg/kg.

— Στα 435 nm

  — 40 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 3 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 5 000 mg/kg·

  — 25 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 5 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 9 000 mg/kg·

  — 5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητα σε ουρία άνω των 9 000 mg/kg.

7.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα σε διαφορετικά εργαστήρια και/ή από διαφορετικούς χειριστές δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— Στα 420 nm

  — τα 3 000 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 3 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 12 000 mg/kg·

  — τα 4 500 mg/kg, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες σε ουρία ίσες ή μεγαλύτερες των 12 000 mg/kg.

— Στα 435 nm

  — 50 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ουρία από 3 000 mg/kg έως χαμηλότερη από 8 000 mg/kg·

  — 25 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε ουρία ίσες ή μεγαλύτερες των 8 000 mg/kg.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Διοργανώθηκε διεργαστηριακή διαδικασία σύγκρισης της ΕΕ στην οποία συμμετείχαν 18 εργαστήρια. Αναλύθηκαν πέντε θετικά δείγματα σύνθετων ζωοτροφών για μηρυκαστικά (στους πίνακες 1 και 2, όπου αναφέρονται ως ΜΑΤ) (ανάλυση 1) σε διπλά τυφλά δείγματα, ενώ αναλύθηκε μία φορά και ένα τυφλό σύνθετης ζωοτροφής για μηρυκαστικά.

Οι υπολογισμοί για τα όρια επαναληψιμότητας (r) και αναπαραγωγιμότητας (R), όπως ορίζονται από τις διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές, πραγματοποιήθηκαν μετά την αφαίρεση των ακραίων τιμών με τη χρήση ανάλυσης μεταβλητότητας των έγκυρων τιμών.

Οι υπολογισθείσες τιμές επιδόσεων της μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα) παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες. Σε όλα τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε δοκιμή, συμπεριλαμβανομένου του τυφλού υλικού, δεν βρέθηκαν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά.

Πίνακας 1

Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου για την ουρία, μετρούμενα σε λ = 420 nm σε όλα τα υλικά

	ΜΑΤ 2	ΜΑΤ 5	ΜΑΤ 3	ΜΑΤ 4	ΜΑΤ 6
	Πρόβατα	Βοοειδή	Πρόβατα	Πρόβατα	Βοοειδή
Στόχος κλάσματος μάζας (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Μέσο κλάσμα μάζας. (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας, s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, s_r (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας, RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Όριο αναπαραγωγιμότητας, R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Όριο επαναληψιμότητας, r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Πίνακας 2

Χαρακτηριστικά επιδόσεων της μεθόδου για την ουρία, μετρούμενα σε λ = 435 nm σε όλα τα υλικά

	ΜΑΤ 2	ΜΑΤ 5	ΜΑΤ 3	ΜΑΤ 4	ΜΑΤ 6
	Πρόβατα	Βοοειδή	Πρόβατα	Πρόβατα	Βοοειδή
Στόχος κλάσματος μάζας (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Μέσο κλάσμα μάζας. (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας, s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, s_r (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167

Σχετική τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας, RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Όριο αναπαραγωγιμότητας, R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Όριο επαναληψιμότητας, r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. **Παρατηρήσεις**

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

9.2. Για χαμηλές περιεκτικότητες σε ουρία, αυξήστε την ποσότητα δοκιμής, αρκεί το διήθημα να παραμείνει διαυγές και άχρουν.

9.3. Τα ανωτέρω αποτελέσματα από τις διεργαστηριακές δοκιμές δεν δείχνουν σημαντική διαφορά ως προς την ακρίβεια μεταξύ της ουρίας που μετράται στα 420 nm και της ουρίας που μετράται στα 435 nm.

Ε. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ (ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ ΘΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ)

Οι μέθοδοι ανάλυσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των αμινοξέων (εκτός της θρυπτοφάνης) είναι:

— EN ISO 13903 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αμινοξέα

— EN ISO 17180 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λυσίνη, μεθειονίνη και θρεονίνη σε εμπορικά προϊόντα αμινοξέων και προμείγματα ([4])

— η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στα σημεία 1 έως 10 κατωτέρω,

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των ελεύθερων (συνθετικών και φυσικών) και ολικών (ενωμένων σε πεπτίδια και ελεύθερων) αμινοξέων σε πρώτες ύλες ζωοτροφών, σύνθετες ζωοτροφές και προμείγματα που περιέχουν λιγότερο από 10 % ([5]) από κάθε αμινοξύ, με χρήση αναλυτή αμινοξέων. Μπορεί να εφαρμοστεί στα ακόλουθα αμινοξέα: κυστ(ε)ίνη, μεθειονίνη, λυσίνη, θρεονίνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη, σερίνη, τυροσίνη και βαλίνη.

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

2. **Αρχή**

2.1. *Ελεύθερα αμινοξέα*

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

([4]) Η μέθοδος ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17180 αναφέρεται ως εναλλακτική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιείται για επίσημους ελέγχους για τον προσδιορισμό των αμινοξέων σε ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο από 10 % αμινοξέα.

([5]) Η μέθοδος αυτή δεν έχει επικυρωθεί μέσω διεργαστηριακής δοκιμής για προμείγματα που περιέχουν περισσότερο από 10 % και πρόσθετες ύλες ζωοτροφών. Ωστόσο, εφαρμόζεται επίσης σε αυτές τις μήτρες με κατάλληλες ελαφρές τροποποιήσεις, υπό την προϋπόθεση ότι η μέθοδος επικυρώνεται στη συνέχεια εσωτερικά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη διεύθυνση https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=el.

2.2. *Ολικά αμινοξέα*

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

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

3. **Αντιδραστήρια**

Πρέπει να χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας (αγωγιμότητα < 10 μS).

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

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

3.3. Φαινόλη.

3.4. Διθειώδες νάτριο.

3.5. Υδροξείδιο του νατρίου.

3.6. Διένυδρο 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ.

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

3.8. Διένυδρο κιτρικό νάτριο.

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

3.10. Χλωριούχο νάτριο

3.11. Νινυδρίνη.

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

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

3.14. Αέριο άζωτο (< 10 ppm οξυγόνο).

3.15. 1-οκτανόλη.

3.16. Αμινοξέα.

3.16.1. Τυπικές ουσίες των αμινοξέων που παρατίθενται στο σημείο 1 (Σκοπός και πεδίο εφαρμογής). Καθαρές ενώσεις που δεν περιέχουν νερό κρυσταλλοποίησης. Ξηραίνονται υπό κενό υπεράνω P_2O_5 or H_2SO_4 για 1 εβδομάδα πριν από τη χρήση.

3.16.2. Κυστεϊνικό οξύ.

3.16.3. Σουλφόνη μεθειονίνης.

3.17. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, c = 7,5 mol/l:

διαλύονται 300 g NaOH (σημείο 3.5) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.18. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, c = 1 mol/l:

διαλύονται 40 g NaOH (σημείο 3.5) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.19. Διάλυμα μυρμηκικού οξέος-φαινόλης:

Αναμειγνύονται 889 g μυρμηκικού οξέος (σημείο 3.2) με 111 g νερού και προστίθενται 4,73 g φαινόλης (σημείο 3.3).

3.20. Μείγμα υδρόλυσης, c = 6 mol HCl/l που περιέχει 1 g φαινόλης/l:

Προστίθεται 1 g φαινόλης (σημείο 3.3) σε 492 ml HCl (σημείο 3.7) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.21. Μείγμα εκχύλισης, c = 0,1 mol HCl/l που περιέχει 2 % θειοδιγλυκόλη: λαμβάνονται 8,2 ml HCl (σημείο 3.7), αραιώνονται με περίπου 900 ml νερού, προστίθενται 20 ml θειοδιγλυκόλης (σημείο 3.9) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό, (τα σημεία 3.7 και 3.9 δεν πρέπει να αναμειγνύονται απευθείας).

3.22. 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ ß = 6 %:

διαλύονται 60 g 5-σουλφοσαλικυλικού οξέος (σημείο 3.6) σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.23. Μείγμα οξείδωσης (υπερμυρμηκικό οξύ-φαινόλη):

Αναμειγνύονται 0,5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (σημείο 3.1) με 4,5 ml διαλύματος μυρμηκικού οξέος-φαινόλης (σημείο 3.19) σε ένα μικρό γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Αφήνεται προς επώαση στους 20-30 °C για 1 ώρα για να σχηματιστεί το υπερμυρμηκικό οξύ, και στη συνέχεια ψύχεται σε λουτρό νερού/πάγου (15 λεπτά) πριν προστεθεί στο δείγμα.

Προσοχή: αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και φοράτε προστατευτικά ρούχα.

3.24. Διάλυμα κιτρικού άλατος, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

Διαλύονται 19,61 g κιτρικού νατρίου (σημείο 3.8), 5 ml θειογλυκόλης (σημείο 3.9), 1 g φαινόλης (σημείο 3.3) και 16,0 ml HCl (σημείο 3.7) σε περίπου 800 ml νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 2,20. Το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.25. Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης, το οποίο παρασκευάζεται ανάλογα με τις συνθήκες του αναλυτή που χρησιμοποιείται (σημείο 4.9).

3.26. Αντιδραστήριο νινυδρίνης, το οποίο παρασκευάζεται ανάλογα με τις συνθήκες του αναλυτή που χρησιμοποιείται (σημείο 4.9).

3.27. Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων. Τα εν λόγω διαλύματα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C.

3.27.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αμινοξέων (σημείο 3.16.1).

c = 2,5 μmol/ml για κάθε αμινοξύ.

Διατίθεται στο εμπόριο.

3.27.2. Αρχικό πρότυπο διάλυμα κυστεϊνικού οξέως και σουλφόνης μεθειονίνης, c = 1,25 μmol/ml.

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

3.27.3. Αρχικό πρότυπο διάλυμα του εσωτερικού προτύπου π.χ. νορλευκίνη, c = 20 μmol/l.

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

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

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

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

Βλέπε επίσης παρατηρήσεις στο σημείο 9.1.

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

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

4. **'Οργανα**

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

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

4.3. Ξηραντήρας με δυναμικό αερισμό και ρυθμιστή θερμοκρασίας ακρίβειας υψηλότερης από ± 2 °C.

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

4.5. Φίλτρο μεμβράνης (0,22 μm).

4.6. Μηχανή φυγοκέντρησης.

4.7. Περιστροφικός εξατμιστής κενού.

4.8. Μηχανικό τάρακτρο (σέικερ) ή μαγνητικός αναδευτήρας

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

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

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

5. **Διαδικασία**

5.1. *Παρασκευή δειγμάτων*

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

5.2. *Προσδιορισμός ελεύθερων αμινοξέων*

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

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

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

Ακολουθεί χρωματογράφηση σύμφωνα με το σημείο 5.4.

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

5.3. *Προσδιορισμός των συνολικών αμινοξέων*

5.3.1. Οξείδωση

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

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

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

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

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

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

Ακολουθείται η διαδικασία του σημείου 5.3.2.1.

5.3.2. Υδρόλυση

5.3.2.1. Υδρόλυση οξειδωμένων δειγμάτων

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

Ανάλογα με τη διαδικασία υδρόλυσης που χρησιμοποιείται, ακολουθείται η διαδικασία του σημείου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

5.3.2.2. Υδρόλυση μη οξειδωμένων δειγμάτων

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

5.3.2.3. Ανοικτή υδρόλυση

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

Ακολουθείται η διαδικασία του σημείου 5.3.3.

5.3.2.4. Κλειστή υδρόλυση

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

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

Ακολουθείται η διαδικασία του σημείου 5.3.3.

5.3.3. Ρύθμιση του pH

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3.4. Διάλυμα δείγματος για χρωματογράφηση

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

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

Ακολουθεί χρωματογράφηση σύμφωνα με το σημείο 5.4.

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

5.4. *Χρωματογράφηση*

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

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

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

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

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

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

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

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

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

A = εμβαδόν κορυφής, υδρόλυμα ή εκχύλισμα

B = εμβαδόν κορυφής, διάλυμα βαθμονόμησης

C = εμβαδόν κορυφής, εσωτερικό πρότυπο στο υδρόλυμα ή εκχύλισμα

D = εμβαδόν κορυφής, εσωτερικό πρότυπο, διάλυμα βαθμονόμησης

M = μοριακό βάρος του υπό προσδιορισμό αμινοξέος

c = συγκέντρωση προτύπου σε μmol/ml

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

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

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

Η μεθειονίνη προσδιορίζεται ως σουλφόνη μεθειονίνης σε υδρολύματα οξειδωμένου δείγματος, υπολογίζεται όμως ως μεθειονίνη χρησιμοποιώντας την τιμή M: 149,21 g/mol.

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

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

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

V = όγκος του τελικού εκχυλίσματος

7. **Αξιολόγηση της μεθόδου**

Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε διεθνή διεργαστηριακή σύγκριση που έγινε το 1990 χρησιμοποιώντας τέσσερις διαφορετικές ζωοτροφές (αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων, φύραμα πουλερικών, συμπύκνωμα πρωτεΐνης, προμείγματα).

Σημείωση: Η μέθοδος δοκιμάστηκε κατά τη διάρκεια δεύτερης διεθνούς μελέτης διεργαστηριακής σύγκρισης το 2003 με τη χρήση διπλών τυφλών ζευγών δειγμάτων ζωοτροφών για την ολοκλήρωση της πάχυνσης για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, ζωοτροφών εκκίνησης για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, αραβοσίτου, ιχθυαλεύρου και αλεύρου πουλερικών. Για λεπτομέρειες, βλέπε EN ISO 13903.

Τα αποτελέσματα της διεργαστηριακής σύγκρισης του 1990, μετά την αφαίρεση των εκτός κλίμακας αποκλίσεων, της μέσης και της σταθερής απόκλισης δίδονται στους πίνακες που ακολουθούν:

Μέσοι όροι σε g/kg

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

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

7.1. *Επαναληψιμότητα*

Η επαναληψιμότητα εκφραζόμενη ως «τυπική απόκλιση εντός εργαστηρίου» της διεργαστηριακής σύγκρισης του προηγούμενου πίνακα εμφαίνεται στον ακόλουθο πίνακα:

Συντελεστής μεταβλητότητας (%) για την επαναληψιμότητα (CV_r)

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

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

7.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

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

Συντελεστής μεταβλητότητας (%) για την αναπαραγωγιμότητα (CV_R)

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

Πρόμειγμα	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων.

8. **Χρήση υλικών αναφοράς**

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

9. **Παρατηρήσεις**

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

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

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

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

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

10. **Κριτήρια απόδοσης**

Η συλλογή των αποτελεσμάτων (εκτός από την τυροσίνη) που προέρχονται από τις 2 συνεργατικές μελέτες (του 1990, της οποίας τα αποτελέσματα αναφέρονται στο σημείο 7 ανωτέρω, και του 2005, όπως αυτά περιγράφονται στο πρότυπο EN/ISO 13903) παρέχει τα ακόλουθα κριτήρια επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας. Οι τιμές που προέκυψαν από τις εν λόγω διεργαστηριακές δοκιμές ενδέχεται να μην ισχύουν για πεδία τιμών συγκέντρωσης και υλικά διαφορετικά από τα αναφερόμενα.

10.1. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα στο ίδιο εργαστήριο και από τον ίδιο χειριστή δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 6 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της γλυκίνης, αλανίνης, λυσίνης, προλίνης, γλουταμινικού οξέος, ισολευκίνης και ιστιδίνης·

— το 8 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της θρεονίνης, φαινυλαλανίνης, μεθειονίνης, του ασπαραγινικού οξέος και της λευκίνης·

— το 10 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της αργινίνης και της βαλίνης·

— το 12 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της σερίνης·

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της κυστ(ε)ίνης.

10.2. *Αναπαραγωγιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα σε διαφορετικά εργαστήρια και/ή από διαφορετικούς χειριστές δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της γλυκίνης, της αλανίνης και της θρεονίνης·

— το 20 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της λυσίνης, της προλίνης, της φαινυλαλανίνης, της μεθειονίνης και του ασπαραγινικού οξέος·

— το 22 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση του γλουταμινικού οξέος και της λευκίνης·

— το 27 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της αργινίνης·

— το 32 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της αργινίνης·

— το 35 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της βαλίνης και της σερίνης·

— το 40 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της ιστιδίνης·

— το 50 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή, για τα ολικά αμινοξέα στην περίπτωση της κυστ(ε)ίνης.

ΣΤ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΘΡΥΠΤΟΦΑΝΗΣ

Οι μέθοδοι ανάλυσης που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της θρυπτοφάνης είναι:

— EN ISO 13904 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε τρυπτοφάνη·

— η μέθοδος ανάλυσης που περιγράφεται στα σημεία 1 έως 9 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

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

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

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Πρέπει να χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης καθαρότητας (αγωγιμότητα < 10 μS/cm).

3.2. Πρότυπη ουσία: θρυπτοφάνη (καθαρότητα/περιεκτικότητα ≥ 99 %) ξηρανθείσα υπό κενό υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου.

3.3. Ουσία εσωτερικού προτύπου: α-μεθυλο-θρυπτοφάνη (καθαρότητα/περιεκτικότητα ≥ 99 %), ξηρανθείσα υπό κενό υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου

3.4. Οκταένυδρο υδροξείδιο του βαρίου [πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε το $Ba(OH)_2.8\ H_2O$ να μην εκτίθεται υπερβολικά στον αέρα για την αποφυγή σχηματισμού $BaCO_3$, πράγμα το οποίο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον προσδιορισμό] (βλέπε σημείο 9.3).

3.5. Υδροξείδιο του νατρίου.

3.6. Ορθοφωσφορικό οξύ, w (w/w) = 85 %.

3.7. Υδροχλωρικό οξύ, ρ_{20} 1,19 g/ml.

3.8. Μεθανόλη, καθαρότητας ισοδύναμης HPLC

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

3.10. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, c = 1 mol/l

40,0 g NaOH (σημείο 3.5) διαλύονται σε νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό (σημείο 3.1).

3.11. Υδροχλωρικό οξύ, c = 6 mol/l:

Λαμβάνονται 492 ml HCl (σημείο 3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.12. Υδροχλωρικό οξύ, c = 1 mol/l:

Λαμβάνονται 82 ml HCl (σημείο 3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.13. Υδροχλωρικό οξύ, c = 0,1 mol/l:

Λαμβάνονται 8,2 ml HCl (σημείο 3.7) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό.

3.14. Ορθοφωσφορικό οξύ, c = 0,5 mol/l:

Λαμβάνονται 34 ml ορθοφωσφορικού οξέος (σημείο 3.6) και συμπληρώνονται μέχρις όγκου 1 λίτρου με νερό (σημείο 3.1).

3.15. Πυκνό διάλυμα θρυπτοφάνης (σημείο 3.2), c = 2,50 μmol/ml:

Σε ογκομετρική φιάλη 500 ml διαλύονται 0,2553 g θρυπτοφάνης (σημείο 3.2) σε υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.13) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.13). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους –18 °C για τέσσερις εβδομάδες το πολύ.

3.16. Πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, c = 2,50 μmol/ml:

Σε ογκομετρική φιάλη 500 ml διαλύονται 0,2728 g α-μεθυλο-θρυπτοφάνης (σημείο 3.3) σε υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.13) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.13). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους –18 °C για τέσσερις εβδομάδες το πολύ.

3.17. Πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης θρυπτοφάνης και εσωτερικού προτύπου:

Λαμβάνονται 2,00 ml πυκνού διαλύματος θρυπτοφάνης (σημείο 3.15), και 2,00 ml πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (α-μεθυλο-θρυπτοφάνη) (σημείο 3.16). Αραιώνονται με νερό (σημείο 3.1) και μεθανόλη (σημείο 3.8) μέχρι περίπου τον ίδιο όγκο και την ίδια περίπου συγκέντρωση μεθανόλης (10-30 %) όπως και το τελικό υδρόλυμα.

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

Κατά τη διάρκεια της παρασκευής, προστατεύεται από το άμεσο ηλιακό φως.

3.18. Οξικό οξύ.

3.19. 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλη.

3.20. Αιθανολαμίνη w (w/w) > 98 %.

3.21. Διάλυμα 1 g 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλης (σημείο 3.19) σε 100 ml μεθανόλης (σημείο 3.8).

3.22. Κινητή φάση για HPLC: 3,00 g οξικό οξύ (σημείο 3.18) + 900 ml νερό (σημείο 3.1) + 50,0 ml διάλυμα (σημείο 3.21) 1,1,1-τριχλωρο-2-μεθυλο-2-προπανόλης (σημείο 3.19) σε μεθανόλη (σημείο 3.8) (1 g/10 ml). Το pH ρυθμίζεται στο 5,00 με αιθανολαμίνη (σημείο 3.20). Συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (σημείο 3.1).

4. **'Οργανα**

4.1. Εξοπλισμός HPLC με φασματοφθορισμομετρικό ανιχνευτή.

4.2. Υγρή χρωματογραφική στήλη, 125 mm × 4 mm, C_{18}, 3 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη.

4.3. pH-μετρο.

4.4. Φιάλη πολυπροπυλενίου, χωρητικότητας 125 ml, ευρύλαιμη και με βιδωτό πώμα.

4.5. Φίλτρο μεμβράνης, 0,45 μm.

4.6. Αυτόκλειστο, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.

4.7. Μηχανικό τάρακτρο (σέικερ) ή μαγνητικός αναδευτήρας.

4.8. Αναμείκτης vortex.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Παρασκευή δειγμάτων*

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

5.2. *Προσδιορισμός ελεύθερης θρυπτοφάνης (εκχύλισμα)*

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

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

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

5.3. *Προσδιορισμός της συνολικής θρυπτοφάνης (υδρόλυμα)*

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

Πριν ανοιχθεί το αυτόκλειστο, η θερμοκρασία μειώνεται λίγο κάτω από τους 100 °C. Για την αποφυγή κρυστάλλωσης του $Ba(OH)_2.8\ H_2O$, προστίθενται στο θερμό μείγμα 30 ml νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Το σύνολο ανακινείται ή αναδεύεται ήπια. Προστίθενται 2,00 ml πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου (α-μεθυλο-θρυπτοφάνης) (σημείο 3.16). Τα δοχεία ψύχονται σε λουτρό νερού/πάγου για 15 λεπτά.

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

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

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

5.4. *Προσδιορισμός με HPLC*

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

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Υπολογίζεται η ποσότητα της θρυπτοφάνης (X), σε g ανά 100 g δείγματος.

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

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

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

V_1 = όγκος σε ml (2 ml) πυκνού διαλύματος θρυπτοφάνης (σημείο 3.15) που προστίθεται στο διάλυμα βαθμονόμησης (σημείο 3.17)

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

V_2 = όγκος σε ml του πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.16) που προστίθεται στην εκχύλιση (σημείο 5.2) = 5,00 ml ή στο υδρόλυμα (σημείο 5.3) = 2,00 ml

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

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

V_3 = όγκος σε ml (= 2,00 ml) πυκνού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.16) που προστίθεται στο πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης (σημείο 3.17)

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

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

7. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά των αποτελεσμάτων των δύο παράλληλα διενεργουμένων προσδιορισμών του ίδιου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

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

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

L = αριθμός υποβληθέντων εργαστηριακών αποτελεσμάτων

n = αριθμός μεμονωμένων αποτελεσμάτων που διατηρούνται απαλείφοντας τις ακραίες τιμές (προσδιορίζονται με τη δοκιμή ακραίων τιμών Cochran, Dixon)

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

r = επαναληψιμότητα

R = αναπαραγωγιμότητα

CV_r = συντελεστής μεταβλητότητας της επαναληψιμότητας, %

CV_R = συντελεστής μεταβλητότητας της αναπαραγωγιμότητας, %.

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

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

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

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

	Δείγμα 1 Αναμεμειγμένη ζωοτροφή χοίρων (CRM 117)	Δείγμα 2 Ιχθυάλευρο με χαμηλά λιπαρά (CRM 118)	Δείγμα 3 Σογιάλευρο (CRM 119)	Δείγμα 4 Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Μέσος όρος [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

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

9. **Παρατηρήσεις**

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

Ισοκρατική έκλουση που ακολουθείται από καθαρισμό της διαβαθμισμένης στήλης:

Υγρή χρωματογραφική στήλη:	125 mm × 4 mm, C_{18}, 5 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη	
Θερμοκρασία στήλης:	32 °C	
Κινητή φάση:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4/μεθανόλη, 95 + 5 (V+V).	
	B: Μεθανόλη	
Πρόγραμμα βαθμίδων:	0 min 100 % A	0 % B
	15 min 100 % A	0 % B
	17 min 60 % A	40 % B
	19 min 60 % A	40 % B
	21 min 100 % A	0 % B
	33 min 100 % A	0 % B
Ρυθμός ροής:	1,2 ml/min	
Συνολικός χρόνος ροής:	περίπου 33 min	

9.2. Η χρωματογραφία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο HPLC και το χρησιμοποιούμενο υλικό πλήρωσης στήλης. Το επιλεγόμενο σύστημα πρέπει να μπορεί να επιτυγχάνει διαχωρισμό βασικής γραμμής μεταξύ θρυπτοφάνης και εσωτερικού προτύπου. Περαιτέρω, παίζει σημαντικό ρόλο τα προϊόντα αποδόμησης να διαχωρίζονται σωστά από τη θρυπτοφάνη και το εσωτερικό πρότυπο. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υδρολύματα χωρίς εσωτερικό πρότυπο για να ελέγχεται η βασική γραμμή υπό το εσωτερικό πρότυπο για προσμείξεις. Παίζει σημαντικό ρόλο ο χρόνος λειτουργίας να είναι αρκετά μεγάλος για την έκλουση όλων των προϊόντων αποδόμησης, διαφορετικά στις επόμενες χρωματογραφικές δοκιμές μπορεί να παρεισφρύσουν όψιμες κορυφές έκλουσης.

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

9.3. *Υδροξείδιο του βαρίου*

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

Ζ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΩΝ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος αποσκοπεί στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ακατέργαστα έλαια και λίπη των ζωοτροφών.

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

Για τον προσδιορισμό των ακατέργαστων ελαίων και λιπών σε ελαιούχους σπόρους και καρπούς καθώς και σε ζωοτροφές στις οποίες η περιεκτικότητα σε ακατέργαστα έλαια/λίπη υπερβαίνει το 15 %, η εκχύλιση θα πρέπει να πραγματοποιείται με τη διαδικασία A και η εκ νέου εκχύλιση με τη διαδικασία B (σημείο 5.3).

1.1. Διαδικασία A — Μέσες εκχυλιζόμενες ακατέργαστες λιπαρές ουσίες

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

1.2. Διαδικασία Β — Ολικά ακατέργαστα έλαια και λίπη

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

1.3. *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*

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

2. **Αρχή**

2.1. *Διαδικασία Α*

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

2.2. *Διαδικασία Β*

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Πετρελαϊκός αιθέρας, διάστημα αναβράσεως: 40 μέχρι 60 °C. Ο δείκτης του βρωμίου πρέπει να είναι κατώτερος από 1 και το υπόλειμμα της εξατμίσεως κατώτερο από 2 mg/100 ml.

3.2. Άνυδρο θειικό νάτριο.

3.3. Υδροχλωρικό οξύ, c = 3 mol/l.

3.4. Επιβοηθητικό διήθησης, π.χ. γη διατόμων, Hyflo-supercel.

4. **Όργανα**

4.1. Συσκευή εκχύλισης. Εάν η συσκευή είναι εφοδιασμένη με σιφώνιο (συσκευή Soxhlet), η παροχή αναρροής ρυθμίζεται προς επίτευξη 10 στροφών τουλάχιστον ανά ώρα. Εφόσον χρησιμοποιείται συσκευή άνευ σιφωνίων, η παροχή του αναρρεούμενου υγρού πρέπει να είναι 10 ml περίπου ανά λεπτό.

4.2. Φυσίγγια εκχύλισης, ελεύθερα διαλυτών στον αιθέρα ουσιών των οποίων το πορώδες ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις του σημείου 4.1.

4.3. Ξηραντήρας, είτε κενού σε 75 °C ± 3 °C, είτε με ατμοσφαιρική πίεση σε 100 °C ± 3 °C.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Διαδικασία Α (βλέπε σημείο 8.1)*

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

Τοποθετείται το φυσίγγιο εντός συσκευής εκχύλισης (σημείο 4.1) και εκχυλίζεται επί 6 ώρες με αιθέρα (σημείο 3.1). Συλλέγεται το εκχύλισμα εντός ξηράς φιάλης, εφοδιασμένης με μερικά τεμάχια κίσσηρης, της οποίας έχει ληφθεί το απόβαρο ([6]).

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

([6]) Όταν η λιπαρή ύλη πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο μεταγενέστερων ποιοτικών εξετάσεων, τα τεμάχια κίσσηρης αντικαθίστανται από γυάλινες χάντρες.

5.2. *Διαδικασία Β*

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

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

Τοποθετείται ο διπλός διηθητικός χάρτης ο οποίος περιέχει το υπόλειμμα σε γυαλί ωρολογίου και ξηραίνεται επί μιάμιση ώρα εντός κλιβάνου αποξήρανσης (σημείο 4.3) σε θερμοκρασία 100 ± 3 °C.

Εισάγεται ο διπλός διηθητικός χάρτης και το ξηρό υπόλειμμα εντός φυσιγγίου εκχύλισης (σημείο 4.2) και καλύπτεται με βαμβακερό πώμα απαλλαγμένου λιπαρών ουσιών (σημείο 4.1). Τοποθετείται το φυσίγγιο εντός συσκευής εκχύλισης και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.1, δεύτερη και τρίτη παράγραφος.

5.3. *Διαδικασία Α και εκ νέου εκχύλιση από τη διαδικασία Β.*

Για τον προσδιορισμό των ακατέργαστων ελαίων και λιπών σε ελαιούχους σπόρους και καρπούς καθώς και σε ζωοτροφές στις οποίες η περιεκτικότητα σε ακατέργαστα έλαια/λίπη υπερβαίνει το 15 %, η εκχύλιση θα πρέπει να πραγματοποιείται με τη διαδικασία Α και η εκ νέου εκχύλιση με τη διαδικασία Β.

Αυτό σημαίνει ότι μετά την εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (διαδικασία Α), το υπόλειμμα ή τμήμα του υπολείμματος επανεκχυλίζεται με υδροχλωρικό οξύ (διαδικασία Β). Η περιεκτικότητα σε ακατέργαστα έλαιο και λίπος είναι το άθροισμα του αποτελέσματος των διαδικασιών Α και Β.

6. **Διατύπωση των αποτελεσμάτων**

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

7. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών, στο ίδιο δείγμα, από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 0,2 %, σε απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες σε ακατέργαστα έλαια και λίπη μικρότερες του 5 %,

— το 4,0 %, του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητα από 5 έως 10 %,

— το 0,4 %, σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες μεγαλύτερες του 10 %.

8. **Παρατηρήσεις**

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

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

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

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

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

όπου:

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

m_2 = βάρος σε γραμμάρια του υπολείμματος του δευτέρου εκχυλίσματος.

8.2. Η ποσότητα του δείγματος ορισμένων προϊόντων (π.χ. χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρές ύλες) μπορεί να αυξηθεί.

8.3. Τροφές ζώων συντροφιάς υψηλής περιεκτικότητας σε νερό πρέπει να αναμειγνύονται με άνυδρο θειικό νάτριο πριν από την υδρόλυση και την εκχύλιση σύμφωνα με τη διαδικασία Β.

8.4. Στο σημείο 5.2, ενδέχεται να είναι αποτελεσματικότερη η χρήση θερμού νερού, αντί του ψυχρού, για την έκπλυση του υπολείμματος μετά τη διήθηση.

8.5. Ο χρόνος ξήρανσης της μιάμισης ώρας είναι πιθανόν να πρέπει να παραταθεί για ορισμένες ζωοτροφές. Πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική ξήρανση, καθώς οδηγεί σε χαμηλές τιμές αποτελεσμάτων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί φούρνος μικροκυμάτων.

Η. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΝΩΔΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

1. **Αντικείμενο και τομέας εφαρμογής**

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

Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται στην περίπτωση της λιγνοκυτταρίνης και του φυτικού άνθρακα (πολύ λεπτά σωματίδια).

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Θειικό οξύ, c = 0,13 mol/l.

3.2. Αντιαφριτικό γαλάκτωμα (π.χ. n-οκτανόλη).

3.3. Διηθητικό μέσο (Celite 545 ή ισοδύναμο), θερμαινόμενο στους 500 °C για τέσσερις ώρες (σημείο 8.6).

3.4. Καθαρή ακετόνη.

3.5. Πετρελαϊκός αιθέρας, περιοχή ζέσεως 40 έως 60 °C.

3.6. Υδροχλωρικό οξύ, c = 0,5 mol/l.

3.7. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, c = 0,23 mol/l.

4. **'Οργανα**

4.1. Θερμαντική μονάδα για την ανοργανοποίηση με θειικό οξύ και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, η οποία διαθέτει στήριγμα για το γυάλινο χωνευτήριο (σημείο 4.2) και σωλήνα εκροής με στρόφιγγα στην έξοδο των υγρών και κενού, ενδεχομένως με συμπιεσμένο αέρα. Κάθε μέρα, πριν από τη χρήση, η μονάδα προθερμαίνεται με βραστό νερό για πέντε λεπτά.

4.2. Γυάλινο χωνευτήριο με διηθητική πλάκα από συντηγμένο γυαλί με πόρους μεγέθους 40-90 μm. Πριν από την πρώτη χρήση, θερμαίνεται στους 500 °C για λίγα λεπτά και αφήνεται να ψυχθεί (σημείο 8.6).

4.3. Κύλινδρος χωρητικότητας τουλάχιστον 270 ml με κάθετο ψυκτήρα, κατάλληλος για βρασμό.

4.4. Κλίβανος αποξήρανσης με θερμοστάτη.

4.5. Ηλεκτρικός κλίβανος με θερμοστάτη.

4.6. Μονάδα εκχύλισης που αποτελείται από πλάκα στήριξης για το γυάλινο χωνευτήριο (σημείο 4.2) και από σωλήνα εκροής με στρόφιγγα στην έξοδο κενού και υγρών.

4.7. Συνδετικοί δακτύλιοι για τη συναρμολόγηση της θερμαντικής μονάδας (σημείο 4.1), του χωνευτηρίου (σημείο 4.2) και του κυλίνδρου (σημείο 4.3), καθώς και για τη σύνδεση της μονάδας εκχύλισης εν ψυχρώ (σημείο 4.6) και του χωνευτηρίου.

5. **Διαδικασία**

Ζυγίζεται 1 g του παρασκευασθέντος δείγματος με προσέγγιση 1 mg και τοποθετείται μέσα στο χωνευτήριο (σημείο 4.2), (βλέπε σημεία 9.1, 9.2 και 9.3).

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

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

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

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

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

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

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

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

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

όπου:

m = βάρος δείγματος σε g,

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

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

7. **Επαναληψιμότητα**

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

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

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

8. **Αναπαραγωγιμότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα σε διαφορετικά εργαστήρια δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— 1,0 % σε απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητα σε ινώδεις ουσίες μικρότερη του 10 %,

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

9. **Παρατηρήσεις**

9.1. Οι ζωοτροφές που περιέχουν περισσότερο του 10 % λιπαρές ουσίες πρέπει να απολιπαίνονται πριν από την ανάλυση με πετρελαϊκό αιθέρα (σημείο 3.5). Το χωνευτήριο (σημείο 4.2) με το περιεχόμενό του συνδέεται με τη μονάδα εκχύλισης εν ψυχρώ (σημείο 4.6). Υπό κενό, τα κατάλοιπα εκπλένονται τρεις φορές με 30 ml πετρελαϊκού αιθέρα κάθε φορά, φροντίζοντας για την ξήρανση των καταλοίπων. Το χωνευτήριο και το περιεχόμενό του συνδέεται με τη θερμαντική μονάδα (σημείο 4.1) και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 5.

9.2. Οι ζωοτροφές που περιέχουν λίπη τα οποία δεν μπορούν να προκύψουν με απευθείας εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (σημείο 3.5) πρέπει να απολιπαίνονται όπως υποδεικνύεται στο σημείο 8.1 και να απολιπαίνονται εκ νέου μετά το βρασμό με οξύ. Μετά το βρασμό με οξύ και την έκπλυση, το χωνευτήριο και το περιεχόμενό του συνδέεται με τη μονάδα εκχύλισης εν ψυχρώ (σημείο 4.6) και εκπλένεται τρεις φορές με 30 ml ακετόνης κάθε φορά, και στη συνέχεια τρεις φορές με 30 ml πετρελαϊκού αιθέρα κάθε φορά. Το προϊόν διηθείται υπό κενό μέχρις ότου αποξηρανθεί και η ανάλυση συνεχίζεται όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5, ξεκινώντας με την κατεργασία με υδροξείδιο του καλίου.

9.3. Αν η ζωοτροφή περιέχει πάνω από 5 % ανθρακικά άλατα καλίου, το χωνευτήριο (σημείο 4.2) με το ζυγισμένο δείγμα συνδέεται με τη θερμαντική μονάδα (σημείο 4.1). Το δείγμα επλένεται τρεις φορές με 30 ml υδροχλωρικού οξέος κάθε φορά (σημείο 3.6). Μετά από κάθε προσθήκη οξέος, το δείγμα αφήνεται για ένα λεπτό περίπου πριν από τη διήθηση. Το δείγμα εκπλένεται μία φορά με 30 ml νερού και η διαδικασία συνεχίζεται όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.

9.4. Αν χρησιμοποιείται συσκευή με τη μορφή βάσης (περισσότερα από ένα χωνευτήρια προσαρτημένα στην ίδια θερμαντική μονάδα), δεν επιτρέπεται η διενέργεια δύο μεμονωμένων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα ανάλυσης στην ίδια σειρά.

9.5. Αν, μετά το βρασμό, η διήθηση των όξινων και βασικών διαλυμάτων είναι δυσχερής, διοχετεύεται συμπιεσμένος αέρας μέσω του σωλήνα εκροής της θερμαντικής μονάδας και στη συνέχεια συνεχίζεται η διήθηση.

9.6. Η θερμοκρασία αποτέφρωσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 500 °C, προκειμένου να παρατείνεται η διάρκεια ζωής του γυάλινου χωνευτηρίου. Χρειάζεται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η υπερβολική θερμική καταπόνηση στη διάρκεια των κύκλων θέρμανσης και ψύξης.

Θ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

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

Η μέθοδος αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε σάκχαρα προς χρήση στον υπολογισμό της ενεργειακής αξίας της ζωοτροφής.

Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα σε σάκχαρα πρέπει να προσδιοριστεί για άλλους σκοπούς, μπορούν να εφαρμοστούν και άλλες μέθοδοι ανάλυσης.

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Αιθανόλη 40 % (κατ' όγκο) πυκνότητας: 0,948 g/ml σε θερμοκρασία 20 °C, και στο σημείο αλλαγής της φαινολοφθαλεΐνης.

3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ και 3 g κρυσταλλικού οξεικού οξέος. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.3. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.

3.4. Διάλυμα 0,1 % (βάρος/όγκο) πορτοκαλόχρου του μεθυλίου.

3.5. Υδροχλωρικό οξύ 4 mol/l.

3.6. Υδροχλωρικό οξύ 0,1 mol/l.

3.7. Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,1 mol/l.

3.8. Αντιδραστήριο κατά Luff-Schoorl:

Ανακινώντας προσεκτικά, μεταγγίστε το διάλυμα του κιτρικού οξέος (σημείο 3.8.2) στο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (σημείο 3.8.3). Κατόπιν προσθέστε το διάλυμα του θειικού χαλκού (σημείο 3.8.1) και συμπληρώστε στο 1 l με νερό. Αφήστε σε ηρεμία μια νύκτα και διηθήστε.

Ελέγξτε τη συγκέντρωση του ληφθέντος αντιδραστηρίου (Cu 0,05 mol/l, Na_2 CO_3 1 mol/l), βλέπε σημείο 5.4 τελευταία παράγραφο. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 9,4 περίπου.

3.8.1. Διάλυμα θειικού χαλκού: Διαλύστε 25 g θειικού χαλκού Cu SO4 $5H_2O$, ελεύθερου σιδήρου, σε 100 ml νερό.

3.8.2. Διάλυμα κιτρικού οξέος: διαλύστε 50 g κιτρικού οξέος, $C_6H_8O_7 \bullet H_2O$ σε 50 ml νερό.

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

3.9. Διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/l.

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

3.11. Θειικό οξύ 3 mol/l.

3.12. Διάλυμα 30 % (κ.ο.) ιωδιούχου καλίου.

3.13. Τεμάχια ελαφρόπετρας κατεργασμένα με βρασμό μέσα σε υδροχλωρικό οξύ, πλυμένα με νερό και στεγνωμένα.

3.14. 3-μεθυλοβουταν-1-όλη

4. **Όργανα**

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

5. **Διαδικασία**

5.1. *Εκχύλιση δείγματος*

Ζυγίστε 2,5 g δείγματος, με προσέγγιση 1 mg, και τοποθετήστε τα μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Προσθέστε 200 ml αιθανόλης (σημείο 3.1) και αναμείξτε επί μία ώρα στον παλινδρομητή. Προσθέστε 5 ml διαλύματος Carrez I (σημείο 3.2) και ανακινήστε επί περίπου 30 δευτερόλεπτα. Προσθέστε κατόπιν 5 ml διαλύματος Carrez II (σημείο 3.3) και ανακινήστε πάλι επί ένα λεπτό. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη (σημείο 3.1), ομογενοποιήστε και διηθήστε. Αφαιρέστε 200 ml από το διήθημα και εξατμίστε περίπου στο μισό όγκο, προκειμένου να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της αιθανόλης. Μεταφέρτε ποσοτικά το υπόλειμμα της εξάτμισης με τη βοήθεια θερμού νερού, σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml, ψύξτε, γεμίστε με νερό μέχρι τη χαραγή, ομογενοποιήστε και διηθήστε αν χρειάζεται. Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων και, έπειτα από ιμβερτοποίηση, τον προσδιορισμό των ολικών σακχάρων.

5.2. *Προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων*

Αφαιρέστε με σιφώνιο μία ποσότητα από το διάλυμα που δεν υπερβαίνει τα 25 ml και περιέχει λιγότερο από 60 mg ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό απεσταγμένο και προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα κατά Luff-Schoorl. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε γλυκόζη επί τοις εκατό.

5.3. *Προσδιορισμός των ολικών σακχάρων μετά από ιμβερτοποίηση*

Αφαιρέστε με σιφώνιο 50 ml διαλύματος και τοποθετήστε τα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Προσθέστε μερικές σταγόνες διαλύματος πορτοκαλόχρου του μεθυλίου (σημείο 3.4) κατόπιν, προσεκτικά και ανακινώντας, υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.5) μέχρι σαφούς αλλαγής στο κόκκινο. Προσθέστε 15 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.6), βυθίστε τη φιάλη σε εντόνως ζέον υδατόλουτρο και αφήστε την εκεί επί 30 λεπτά. Ψύξτε ταχέως στους 20 °C περίπου και προσθέστε 15 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (σημείο 3.7). Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό και ομογενοποιήστε. Αφαιρέστε μια ποσότητα που δεν υπερβαίνει τα 25 ml και περιέχει λιγότερο από 60 mg ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό απεσταγμένο και προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα κατά Luff-Schoorl. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό γλυκόζης ή, όπου χρειάζεται, σε σακχαρόζη κατόπιν πολλαπλασιασμού με τον συντελεστή 0,95.

5.4. *Ογκομέτρηση κατά Luff-Schoorl*

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

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

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

7. **Ιδιαίτεροι τρόποι εργασίας**

7.1. Για ζωοτροφές πολύ πλούσιες σε μελάσσα και άλλες μη ιδιαίτερης ομοιογένειας, ζυγίστε 20 g και τοποθετήστε τα σε ογκομετρική φιάλη του 1 l με 500 ml νερό. Αναμείξτε επί μία ώρα στον παλινδρομητή. Αποστραγγίστε με τη βοήθεια των διαλυμάτων Carrez I (σημείο 3.2) και II (σημείο 3.3) όπως περιγράφεται στο σημείο 5.1 χρησιμοποιώντας όμως μια ποσότητα 4 φορές υψηλότερη για κάθε αντιδραστήριο. Συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με 80 % αιθανόλη (κατ' όγκο).

Ομογενοποιήστε και διηθήστε. Απομακρύντε την αιθανόλη όπως περιγράφεται στο σημείο 5.1. Επί απουσίας δεξτρινοποιημένου αμύλου, συμπληρώστε μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό.

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

8. **Παρατηρήσεις**

8.1. Συνιστάται να προστεθεί περίπου 1 ml 3-μεθυλοβουταν-1-όλης (σημείο 3.14) (χωρίς να ληφθεί υπόψη ο όγκος), πριν το βρασμό με το αντιδραστήριο Luff-Schoorl, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.

8.2. Η διαφορά μεταξύ της περιεκτικότητας σε ολικά σάκχαρα μετά την ιμβερτοποίηση, εκφρασμένα σε γλυκόζη, και της περιεκτικότητας σε ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε γλυκόζη, πολλαπλασιασμένη επί 0,95, δίνει την περιεκτικότητα σε σακχαρόζη επί τοις εκατό.

8.3. Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ανάγοντα σάκχαρα, με εξαίρεση τη λακτόζη, δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

8.3.1. Για έναν κατά προσέγγιση υπολογισμό, πολλαπλασιάζουμε επί 0,675 την περιεκτικότητα σε λακτόζη προσδιορισμένη με ξεχωριστό προσδιορισμό και αφαιρούμε το αποτέλεσμα από την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα.

8.3.2. Για έναν ακριβή υπολογισμό των αναγόντων σακχάρων, με εξαίρεση τη λακτόζη, είναι απαραίτητο να ξεκινήσουμε από την ίδια ποσότητα δοκιμής για τους δύο τελικούς προσδιορισμούς. Η μία από τις αναλύσεις πραγματοποιείται επί ενός τμήματος του διαλύματος που λαμβάνεται σύμφωνα με το σημείο 5.1, η άλλη επί ενός τμήματος του διαλύματος που λαμβάνεται κατά τον προσδιορισμό της λακτόζης σύμφωνα με τη μέθοδο που προβλέπεται για το σκοπό αυτό (έπειτα από ζύμωση των άλλων ειδών σακχάρων και αποστράγγιση).

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

Παράδειγμα

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

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

Η διαφορά συνίσταται σε 16,6 mg γλυκόζης.

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

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

Πίνακας τιμών για 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl

ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/litre, δύο λεπτά θέρμανση, δέκα λεπτά βρασμός

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Γλυκόζη, φρουκτόζη ιμβερτοποιημένα σάκχαρα $C_6H_{12}O_6$		Λακτόζη $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/litre
ml	mg	διαφορά	mg	διαφορά	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

I. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΑΚΤΟΖΗΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

Τα σάκχαρα διαλύονται σε νερό. Το διάλυμα υποβάλλεται σε ζύμωση με τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* που αφήνει τη λακτόζη ανέπαφη. Έπειτα από αποστράγγιση και διήθηση, η περιεκτικότητα σε λακτόζη του διηθήματος προσδιορίζεται με τη μέθοδο Luff-Schoorl.

3. **Αντιδραστήρια**

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

3.2. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ και 3 g κρυσταλλικού οξεικού οξέος. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.3. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.

3.4. Αντιδραστήριο κατά Luff-Schoorl:

Ανακινώντας προσεκτικά, μεταγγίστε το διάλυμα του κιτρικού οξέος (σημείο 3.4.2) στο διάλυμα του ανθρακικού νατρίου (σημείο 3.4.3). Προσθέστε στη συνέχεια το διάλυμα του θειικού χαλκού (σημείο 3.4.1) και συμπληρώστε στο 1 l με νερό. Αφήστε σε ηρεμία μια νύκτα και διηθήστε. Ελέγξτε την καυστικότητα του ληφθέντος διαλύματος (Cu 0,05 mol/litre· Na_2 CO_3 1 mol/litre). Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 9,4 περίπου.

3.4.1. Διάλυμα θειικού χαλκού: Διαλύστε 25 g θειικού χαλκού Cu SO_4 $5H_2O$, ελεύθερου σιδήρου, σε 100 ml νερό.

3.4.2. Διάλυμα κιτρικού οξέος: διαλύστε 50 g κιτρικού οξέος, $C_6H_8O_7 \bullet H_2O$ σε 50 ml νερό.

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

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

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

3.7. Θειικό οξύ 3 mol/litre.

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

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

4. **'Οργανα**

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

5. **Διαδικασία**

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

Προσθέστε 2,5 ml διαλύματος Carrez I (σημείο 3.2) και ανακινήστε επί τριάντα δευτερόλεπτα, προσθέστε κατόπιν 2,5 ml διαλύματος Carrez II (σημείο 3.3) και ανακινήστε εκ νέου, επί τριάντα δευτερόλεπτα. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό, αναμείξτε και διηθήστε. Αφαιρέστε με σιφώνιο μία ποσότητα διηθήματος όχι μεγαλύτερη από 25 ml η οποία περιέχει κατά προτίμηση 40 έως 80 mg λακτόζης και τοποθετήστε τη σε κωνική φιάλη των 300 ml. Αν χρειάζεται, συμπληρώστε στα 25 ml με νερό.

Προβείτε κατά τον ίδιο τρόπο σε τυφλό πείραμα με 5 ml εναιωρήματος μαγιάς (σημείο 3.1). Προσδιορίστε την περιεκτικότητα σε λακτόζη κατά Luff-Schoorl ως ακολούθως: Προσθέστε 25 ml ακριβώς αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl (σημείο 3.4) και δύο τεμάχια ελαφρόπετρας (σημείο 3.5). Θερμάνατε ανακινώντας με το χέρι, πάνω από ελεύθερη φλόγα μέσου ύψους και φέρτε το υγρό σε βρασμό εντός δύο λεπτών περίπου. Τοποθετήστε αμέσως την κωνική φιάλη πάνω σε μεταλλικό πλέγμα εφοδιασμένο με οθόνη αμιάντου και οπή διαμέτρου περίπου 6 cm,

κάτω από την οποία έχει αναφθεί φλόγα. Η φλόγα είναι ρυθμισμένη κατά τρόπο ώστε μόνο ο πυθμένας της φιάλης να θερμαίνεται. Προσαρμόστε κατόπιν έναν ψυκτήρα επαναφοράς στην κωνική φιάλη. Από τη στιγμή αυτή ζέει επί 10 λεπτά ακριβώς. Ψύξτε αμέσως σε ψυχρό νερό και μετά από 5 λεπτά περίπου, ογκομετρήστε ως ακολούθως:

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

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

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

7. **Παρατήρηση**

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

2. Στις ζωοτροφές «με μειωμένη λακτόζη» (π.χ. γάλα για γάτες), η λακτόζη μετατρέπεται σε φρουκτόζη, η οποία δεν έχει υποστεί πλήρη ζύμωση εντός 2 ωρών με αποτέλεσμα υψηλότερα ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα (καθώς παραμένουν υπολείμματα φρουκτόζης στο εκχύλισμα).

Πίνακας τιμών για 25 ml αντιδραστηρίου κατά Luff-Schoorl

ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/litre, δύο λεπτά θέρμανση, δέκα λεπτά βρασμός

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/litre	Γλυκόζη, φρουκτόζη ιμβερτοποιημένα σάκχαρα $C_6H_{12}O_6$		Λακτόζη $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	διαφορά	mg	διαφορά	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

ΙΑ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΥΛΟΥ

ΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο και σε προϊόντα διάσπασης των υψηλών μοριακών βαρών αμύλου των ζωοτροφών με στόχο τον έλεγχο συμμόρφωσης προς τη δηλούμενη ενεργειακή αξία (βλέπε διατάξεις του παραρτήματος VII) και προς τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 767/2009.

Η μέθοδος αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο προς χρήση στον υπολογισμό της ενεργειακής αξίας της ζωοτροφής.

Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα σε άμυλο πρέπει να προσδιοριστεί για άλλους σκοπούς, μπορούν να εφαρμοστούν και άλλες μέθοδοι ανάλυσης.

2. **Αρχή**

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

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

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

3. **Αντιδραστήρια**

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

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

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

3.3. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ και 3 g κρυσταλλικού οξεικού οξέος. Συμπληρώνεται με νερό έως 100 ml.

3.4. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου, $K_4\ Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Συμπληρώνεται με νερό έως 100 ml.

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

4. **Όργανα**

4.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) 250 ml με σύνηθες εσμυρισμένο πώμα συνδεδεμένη με κάθετο ψυκτήρα.

4.2. Πολωσίμετρο ή σακχαρόμετρο.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Προετοιμασία του δείγματος*

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

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

Ζυγίζονται 2,5 g κονιοποιημένου δείγματος με προσέγγιση 1 mg και εισάγονται εντός ογκομετρικής φιάλης των 100 ml. Προστίθενται 25 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.2), ανακινούνται προς επίτευξη καλής κατανομής της ποσότητας του δείγματος και προστίθενται εκ νέου άλλα 25 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.2). Η φιάλη εμβαπτίζεται εντός ζέοντος υδρόλουτρου και κατά τη διάρκεια των πρώτων επομένων 3 λεπτών ανακινείται έντονα και σταθερά προς αποφυγή σχηματισμού συσσωματώσεων. Η ποσότητα του νερού στο υδρόλουτρο πρέπει να είναι επαρκής για να επιτρέπει τη διατήρηση του λουτρού στο σημείο βρασμού κατά το χρονικό διάστημα της παραμονής της φιάλης εντός αυτού. Η φιάλη δεν πρέπει να εξέρχεται του λουτρού κατά τη διάρκεια της ανακίνησης. Μετά πάροδο 15 λεπτών ακριβώς εξάγεται η φιάλη από το λουτρό, προστίθενται 30 ml ψυχρού νερού και ψύχεται αμέσως σε 20 °C.

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

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

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

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

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

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

6.1. *Μετρήσεις διενεργούμενες με πολωσίμετρο*

$$\text{Περιεκτικότητα σε άμυλο (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

P = συνολική στροφική ικανότητα σε μοίρες

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

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

+ 185,9°: άμυλο ορύζης

+ 185,7°: άμυλο γεωμήλων

+ 184,6°: άμυλο αραβοσίτου

+ 182,7: άμυλο σίτου

+ 181,5°: άμυλο κριθής

+ 181,3°: άμυλο βρώμης

+ 184,0: άλλοι τύποι και μείγματα αμύλου των σύνθετων ζωοτροφών

6.2. *Μετρήσεις διενεργούμενες με σακχαρόμετρο*

$$\text{Περιεκτικότητα σε άμυλο (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20°}} \times \frac{(2\ N \times 0{,}665) \times (S - S')}{100} - \frac{26{,}6\ N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

S = συνολική οπτική στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς

S' = οπτική στροφική ικανότητα σε σακχαρομετρικούς βαθμούς των ουσιών που διαλύονται, σε αιθανόλη 40 % (ο/ο)

N = βάρος σε g σακχαρόζης εντός 100 ml νερού που παρέχουν οπτική στροφική ικανότητα 100 σακχαρομετρικών βαθμών εντός σωλήνος 200 mm

16,29 g για γαλλικά σακχαρόμετρα

26,00 g για γερμανικά σακχαρόμετρα

20,00 g για μεικτά σακχαρόμετρα

$[\alpha]_D^{20°}$ = ειδική οπτική στροφική ικανότητα καθαρού αμύλου (βλέπε σημείο 6.1)

6.3. *Επαναληψιμότητα*

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

7. **Παρατηρήσεις**

7.1. Εάν το δείγμα περιέχει ανθρακικά άλατα πλέον του 6 % εκφρασμένα σε ανθρακικά άλατα ασβεστίου, πρέπει αυτά να εξουδετερωθούν με τη χρήση της απαιτουμένης ακριβούς ποσότητας αραιωμένου θειικού οξέος, πριν από τον προσδιορισμό της συνολικής οπτικής στροφικής ικανότητας.

7.2. Στην περίπτωση προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη, όπως η σκόνη ορού γάλακτος ή το αποβουτυρωμένο γάλα, διενεργούνται τα ακόλουθα, κατόπιν προσθήκης 80 ml αιθανόλης (σημείο 3.5). Προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας στη φιάλη, εμβαπτίζεται η φιάλη σε υδατόλουτρο 50 C επί 30 λεπτά. Αφήνεται ακολούθως να ψυχθεί και συνεχίζεται η ανάλυση όπως υποδεικνύεται ανωτέρω στο σημείο 5.3.

7.3. Οι ακόλουθες πρώτες ύλες ζωοτροφών, σε περίπτωση παρουσίας τους σε σημαντική ποσότητα στις ζωοτροφές, είναι γνωστό ότι προκαλούν παράσιτα κατά τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο με την πολωσιμετρική μέθοδο και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα:

— προϊόντα ζαχαροτεύτλων όπως πούλπα ζαχαροτεύτλων, μελάσα ζαχαροτεύτλων, μελασωμένη πούλπα ζαχαροτεύτλων, βινάσα ζαχαροτεύτλων, ζάχαρη ζαχαροτεύτλων·

— πούλπα εσπεριδοειδών·

— λιναρόσπορος· πλακούντες έκθλιψης λιναρόσπορου· πλακούντες εκχυλισμένου λιναρόσπορου,

— σπόροι κράμβης· πλακούντες έκθλιψης κραμβόσπορων πλακούντες εκχυλισμένων κραμβόσπορων· φλοιοί κραμβόσπορων,

— ηλιανθόσπορος· πλακούντες εκχυλισμένου ηλιανθόσπορου· πλακούντες εκχυλισμένου μερικώς αποφλοιωμένου ηλιανθόσπορου,

— πλακούντες έκθλιψης φοινικοκαρυάς, πλακούντες εκχυλισμένης φοινικοκαρυάς,

— πούλπα γεωμήλων,

— αφυδατωμένη μαγιά,

— προϊόντα πλούσια σε ινουλίνη (π.χ. κατάλοιπα επεξεργασίας και άλευρα κολοκασίου),

— υπολείμματα ζωικού λίπους.

— προϊόντα σόγιας

Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος ανάλυσης που προβλέπεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 121/2008 της Επιτροπής ([7]). Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για ζωοτροφές που περιέχουν λιγότερο από 1 % άμυλο.

([7]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 121/2008 της Επιτροπής, της 11ης Φεβρουαρίου 2008, σχετικά με τον καθορισμό της μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άμυλο στα παρασκευάσματα των τύπων που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των ζώων (κωδικός ΣΟ 2309) (ΕΕ L 37 της 12.2.2008, σ. 3).

ΙΒ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΗΣ ΤΕΦΡΑΣ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

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

4. **Όργανα**

4.1. Θερμαντική πλάκα.

4.2. Ηλεκτρική κάμινος με θερμοστάτη.

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

5. **Διαδικασία**

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

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

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Υπολογίστε το βάρος του υπολείμματος με αφαίρεση του απόβαρου.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό του δείγματος.

7. **Παρατηρήσεις**

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

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

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

ΙΓ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ ΑΔΙΑΛΥΤΗΣ ΣΤΟ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟ ΟΞΥ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

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

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

2. **Αρχή**

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

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Υδροχλωρικό οξύ 3 mol/litre.

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

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

4. **'Οργανα**

4.1. Θερμαινόμενη πλάκα.

4.2. Ηλεκτρική κάμινος με θερμοστάτη.

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

4.4. Φίλτρα ελεύθερα τέφρας

5. **Διαδικασία**

5.1. *Μέθοδος Α:*

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

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

5.2. *Μέθοδος Β*

Ζυγίστε, με προσέγγιση 1 mg, 5 g δείγματος και τοποθετήστε τα σε ποτήρι των 250 έως 400 ml. Προσθέστε διαδοχικά 25 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.1), αναμείξτε και περιμένετε να τελειώσει ο αναβρασμός. Προσθέστε ακόμη 50 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.1). Περιμένετε το τέλος μιας ενδεχόμενης έκλυσης αερίου, τοποθετήστε εν συνεχεία το ποτήρι μέσα σε ζέον υδατόλουτρο και διατηρήστε το εκεί επί 30 λεπτά ή περισσότερο, αν χρειάζεται, προκειμένου να υδρολυθεί πλήρως το άμυλο που ενδεχομένως υπάρχει. Διηθήστε εν θερμώ επί ηθμού απαλλαγμένου τέφρας και πλύντε τον ηθμό με τη βοήθεια 50 ml θερμού νερού (βλέπε παρατήρηση στο σημείο 7). Τοποθετήστε τον ηθμό που περιέχει το υπόλειμμα μέσα σε κάψα αποτέφρωσης, ξηράνατε και αποτεφρώστε σε θερμοκρασία 550 °C τουλάχιστον και 700 °C κατ' ανώτατο όριο.Τοποθετήστε την τέφρα μέσα σε ποτήρι των 250 έως 400 ml με τη βοήθεια 75 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.1)·ακολουθήστε τα υποδεικνυόμενα στο σημείο 5.1, δεύτερο εδάφιο.

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

7. **Παρατήρηση**

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

ΙΔ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ

Η περιεκτικότητα σε ολικού φωσφόρου προσδιορίζεται με

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 15510 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου, κοβαλτίου, μολυβδαινίου, αρσενικού και μολύβδου με ICP-AES, ή

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 15621 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, θείου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου, και κοβαλτίου μετά από χώνευση υπό πίεση με ICP-AES, ή

— τη φωτομετρική μέθοδος όπως περιγράφεται κατωτέρω.

ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Ανθρακικό ασβέστιο.

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

3.3. Νιτρικό οξύ, ρ_{20} = 1,045 g/ml.

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

3.5. Θειικό οξύ, ρ_{20} = 1,84 g/ml.

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

3.6.1. Διάλυμα επταμολυβδαινικού αμμωνίου: Σε θερμό νερό διαλύονται 100 g επταμολυβδαινικού αμμωνίου (NH_4) $6Mo_7O_{24}.4H_2O$. Προστίθενται 10 ml αμμωνίας (πυκνότητας 0,91 g/ml) και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι ενός λίτρου.

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

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

4. **Όργανα**

4.1. Χωνευτήρια αποτέφρωσης από πυρίτιο, πορσελάνη ή πλατίνα.

4.2. Ηλεκτρική κάμινος με διαμερίσματα εφοδιασμένη με θερμοστάτη ρυθμισμένο στους 550 °C.

4.3. Φιάλη Kjeldahl των 250 ml.

4.4. Ογκομετρικές φιάλες και σιφώνια ακριβείας.

4.5. Φασματοφωτόμετρο.

4.6. Δοκιμαστικοί σωλήνες διαμέτρου 16 mm περίπου με σμυριδωμένα στόμια διαμέτρου 14,5 mm·χωρητικότητα: 25 έως 30 ml.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Παρασκευή του διαλύματος*

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, παρασκευάζεται διάλυμα όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.1.1 ή 5.1.2.

5.1.1. Συνήθης διαδικασία

Ζυγίζεται ένα 1 g ή περισσότερο δείγματος με προσέγγιση 1 mg. Η ποσότητα του δείγματος εισάγεται εντός φιάλης Kjeldahl, προστίθεται ποσότητα 20 ml θειικού οξέος (σημείο 3.5), ανακινείται προς πλήρη διαποτισμό των υλών με το οξύ και προς αποφυγή επικάθισης αυτών των υλών επί των πλευρών της φιάλης, θερμαίνεται και διατηρείται επί 10 λεπτά σε κατάσταση βρασμού. Αφήνεται να ψυχθεί ελαφρώς, προστίθενται 2 ml νιτρικού οξέος (σημείο 3.4), θερμαίνεται ηπίως, αφήνεται να ψυχθεί ελαφρώς, προστίθεται εκ νέου λίγο νιτρικό οξύ (σημείο 3.4) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Επαναλαμβάνονται οι ίδιες ενέργειες μέχρι την επίτευξη αχρώμου διαλύματος. Ψύχεται, προστίθεται λίγο νερό, μεταγγίζεται το υγρό εντός ογκομετρικής φιάλης των 500 ml, εκπλύνοντας τη φιάλη Kjeldahl με θερμό νερό. Αφήνεται να ψυχθεί, ο όγκος συμπληρώνεται με νερό, ομοιογενοποιείται και διηθείται.

5.1.2. Δείγματα που περιέχουν οργανικές ύλες και ελεύθερα δισόξινου φωσφορικού ασβεστίου και μαγνησίου

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

5.2. *Ανάπτυξη του χρωματισμού και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας*

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

5.3. *Καμπύλη βαθμονόμησης*

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

Το αποτέλεσμα εκφράζεται επί τοις εκατό του δείγματος.

Επαναληψιμότητα

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

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

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

ΙΕ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΛΩΡΙΟΥ ΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥΧΩΝ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Διάλυμα θειοκυανιούχου αμμωνίου 0,1 mol/litre.

3.2. Διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1 mol/litre.

3.3. Κεκορεσμένο διάλυμα θειικού σιδηροαμμωνίου $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

3.4. Νιτρικό οξύ, πυκνότητα: 1,38 g/ml.

3.5. Διαιθυλικός αιθέρας.

3.6. Ακετόνη.

3.7. Διάλυμα Carrez I: Διαλύονται σε νερό 21,9 g οξεικού ψευδαργύρου $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ και 3 g κρυσταλλικού οξεικού οξέος. Φέρεται στα 100 ml με νερό.

3.8. Διάλυμα Carrez II: διαλύονται σε νερό 10,6 g σιδηροκυανιούχου καλίου $K_4Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Συμπληρώστε στα 100 ml με νερό.

3.9. Ενεργός άνθρακας, απαλλαγμένος χλωριούχων και μη επιδεκτικός προσρόφησης χλωριούχων.

4. **'Οργανα**

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

5. **Διαδικασία**

5.1. *Παρασκευή του διαλύματος*

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

Πραγματοποιήστε παράλληλα απαλλαγμένο από το προς ανάλυση δείγμα.

5.1.1. Δείγματα απαλλαγμένα οργανικής ύλης

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

5.1.2. Δείγματα που περιέχουν οργανικές ύλες, εκτός των προϊόντων που αναφέρονται στο σημείο 5.1.3.

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

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

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

5.2. *Ογκομέτρηση*

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

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

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

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

όπου:

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

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

m = g βάρους του δείγματος.

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

7. **Παρατηρήσεις**

7.1. Η ογκομέτρηση μπορεί επίσης να γίνει ποτενσιομετρικώς.

7.2. Για προϊόντα πολύ πλούσια σε λιπαρές ύλες, προχωρήστε σε προηγούμενη απολίπανση με διαιθυλικό αιθέρα ή πετρελαϊκό αιθέρα.

7.3. Για ιχθυάλευρα, η ογκομέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο Mohr.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΣΕ ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΥΛΕΣ

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Α

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17547 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε βιταμίνη Α, Ε και D [1] — Μέθοδος καθαρισμού εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ή

— υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με τη χρήση φασματοφθορομετρικού ανιχνευτή (φθορισμού), όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 9 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

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

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Αιθανόλη, σ = 96 %.

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

3.3. Μεθανόλη.

3.4. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, c = 50 g/100 ml.

3.5. Διάλυμα ασκορβικού νατρίου, c = 10 g/100 ml (βλέπε σημείο 7.7).

3.6. Θειούχο νάτριο, $Na_2S \cdot x\ H_2O$ (x = 7 – 9).

3.6.1. Διάλυμα θειούχου νατρίου, c = 0,5 mol/l σε γλυκερόλη, ß = 120 g/l (για x = 9) (βλέπε σημείο 7.8).

3.7. Διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης, c = 2 g/100 ml σε αιθανόλη (σημείο 3.1).

3.8. 2-προπανόλη.

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

3.10. Άζωτο, απαλλαγμένο οξυγόνου.

[1] Η μέθοδος ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17547 αναφέρεται ως εναλλακτική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιείται για επίσημους ελέγχους για τον προσδιορισμό της βιταμίνης Α και Ε αντί της μεθόδου που περιγράφεται για τον προσδιορισμό της βιταμίνης Α στο μέρος Α του παρόντος παραρτήματος και για τη βιταμίνη Ε στο μέρος Β του παρόντος παραρτήματος.

3.11. Οξική ολο-trans-βιταμίνη A, εξαιρετικής καθαρότητας, πιστοποιημένης δραστικότητας, π.χ. 2,80 × 106 IU/g.

3.11.1. Αρχικό διάλυμα οξικής ολο-trans-βιταμίνης A: Σε ογκομετρική φιάλη 100 ml ζυγίζονται με προσέγγιση 0,1 mg, 50 mg οξικής βιταμίνης A (σημείο 3.11). Διαλύονται σε 2-προπανόλη (σημείο 3.8) και συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Η ονομαστική συγκέντρωση του εν λόγω διαλύματος είναι 1 400 IU βιταμίνης A ανά ml. Η ακριβής συγκέντρωση πρέπει να προσδιορίζεται σύμφωνα με το σημείο 5.6.3.1.

3.12. Παλμιτική ολο-trans-βιταμίνη A, εξαιρετικά καθαρή, πιστοποιημένης δραστικότητας, π.χ. 1,80 × 10^6 IU/g.

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

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

4. **'Οργανα**

4.1. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.

4.2. Αδιαφανή γυάλινα σκεύη.

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

4.2.2. Ογκομετρικές στενόλαιμες φιάλες με εσμυρισμένα πώματα των 10, 25, 100 και 500 ml.

4.2.3. Κωνικές διαχωριστικές χοάνες των 1 000 ml, με εσμυρισμένα πώματα.

4.2.4. Απιοειδείς φιάλες των 250 ml, με εσμυρισμένες υποδοχές.

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

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

4.5. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης.

4.5.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, C_{18}, 5 ή 10 μm με πλήρωση 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη (κριτήριο απόδοσης: μία μόνον κορυφή για όλα τα ισομερή ρετινόλης υπό τις συνθήκες HPLC).

4.5.2. Ανιχνευτής UV ή φθορισμού, με μεταβαλλόμενο μήκος κύματος.

4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες χαλαζία των 10 mm.

4.7. Υδατόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα.

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

4.8.1. Γυάλινο κύλινδρο χωρητικότητας 1 l με εσμυρισμένο λαιμό και πώμα

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

5. **Διαδικασία**

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

5.1. *Προετοιμασία του δείγματος*

Το δείγμα αλέθεται έτσι ώστε να διέρχεται από κόσκινο με διάμετρο οπών 1 mm, προσέχοντας να μην παράγεται θερμότητα. Η άλεση πρέπει να γίνεται πριν από τη ζύγιση και τη σαπωνοποίηση, αλλιώς μπορεί να υπάρξουν απώλειες βιταμίνης Α. Το/τα δείγμα/-τα να μην αλέθεται/-ονται εάν η κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων είναι επαρκής (π.χ. προμείγματα και πρόσθετες ύλες ζωοτροφών).

5.2. *Σαπωνοποίηση*

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

5.3. *Εκχύλιση*

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

5.3.1. Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη (σημείο 4.2.3)

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

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

5.3.2. Εκχύλιση με συσκευή εκχύλισης (σημείο 4.8)

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

Τα συνενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται όπως περιγράφεται στο σημείο 5.3.1 και ακολουθείται η περιγραφόμενη εκεί διαδικασία.

5.4. *Παρασκευή του δείγματος για την HPLC*

Σε απιοειδή φιάλη 250 ml (σημείο 4.2.4) μεταφέρεται με πιπέτα (σιφώνιο) κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος πετρελαϊκού αιθέρα (από το σημείο 5.3.1 ή 5.3.2). Ο διαλύτης εξατμίζεται σχεδόν μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (σημείο 4.1) με ελαττωμένη πίεση και θερμοκρασία λουτρού μη υπερβαίνουσα τους 40 °C.Αποκαθίσταται η ατμοσφαιρική πίεση με εισαγωγή αζώτου (σημείο 3.9) και η φιάλη απομακρύνεται από τον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ο παραμένων διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (σημείο 3.10) και το υπόλειμμα διαλύεται αμέσως σε γνωστό όγκο (10-100 ml) μεθανόλης (σημείο 3.3) (η συγκέντρωση της βιταμίνης A πρέπει να είναι της τάξεως των 5 IU/ml έως 30 IU/ml).

5.5. *Προσδιορισμός με HPLC*

Η βιταμίνη A διαχωρίζεται σε στήλη ανάστροφης φάσης C_{18} (σημείο 4.5.1) και μετράται η συγκέντρωση με τη βοήθεια ανιχνευτή UV (325 nm) ή φθορισμού (διέγερση: 325 nm, εκπομπή: 475 nm) (σημείο 4.5.2).

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

Συνθήκες HPLC

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

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

5.6. *Βαθμονόμηση*

5.6.1. Παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας

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

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

5.6.2. Παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και καμπύλη βαθμονόμησης

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

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

5.6.3. Τυποποίηση σε UV των πρότυπων διαλυμάτων

5.6.3.1. Αρχικό διάλυμα οξικής βιταμίνης A

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

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

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

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

5.6.3.2. Αρχικό διάλυμα παλμιτικής βιταμίνης A

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

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

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

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

5.6.3.3. Πρότυπο διάλυμα εργασίας βιταμίνης A

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

Υπολογισμός της συγκέντρωσης βιταμίνης A:

$$\text{IU βιταμίνη A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

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

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

όπου:

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

V_1 = όγκος του δείγματος (σημείο 5.4) σε ml

V_2 = όγκος της ποσότητας που λαμβάνεται στο σημείο 5.4 σε ml

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Παρατηρήσεις**

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

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

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

7.4. Με μουρουνέλαιο και άλλα καθαρά λίπη, ο χρόνος σαπωνοποίησης πρέπει να παρατείνεται στα 45-60 λεπτά.

7.5. Αντί BHT, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδροκινόνη.

7.6. Χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης ο διαχωρισμός των ισομερών ρετινόλης είναι εφικτός. Σε αυτή την περίπτωση όμως πρέπει να αθροίζονται τα ύψη (εμβαδά) όλων των κορυφών των ισομερών cis και trans για τους υπολογισμούς.

7.7. Αντί διαλύματος ασκορβικού νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 150 mg ασκορβικού οξέος.

7.8. Αντί διαλύματος θειούχου νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 50 mg EDTA.

7.9. Σε περιπτώσεις ανάλυσης της βιταμίνης A σε υποκατάστατα γάλακτος, πρέπει να αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στις εξής διεργασίες:

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

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

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

8. **Επαναληψιμότητα**

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

9. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης** ([2])

	Πρόμειγμα	Πρόμειγμα ζωοτροφής	Συμπύκνωμα ανόργανων υλικών	Πρωτεϊνούχος ζωοτροφή	Ζωοτροφή για χοιρίδια
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Μέσος όρος [IU/kg]	17,02 × 106	1,21 × 106	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	0,51 × 106	0,039 × 106	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 × 106	0,109 × 106	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	1,36 × 106	0,069 × 106	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	3,81 × 106	0,193 × 106	129 640	64 568	10 119

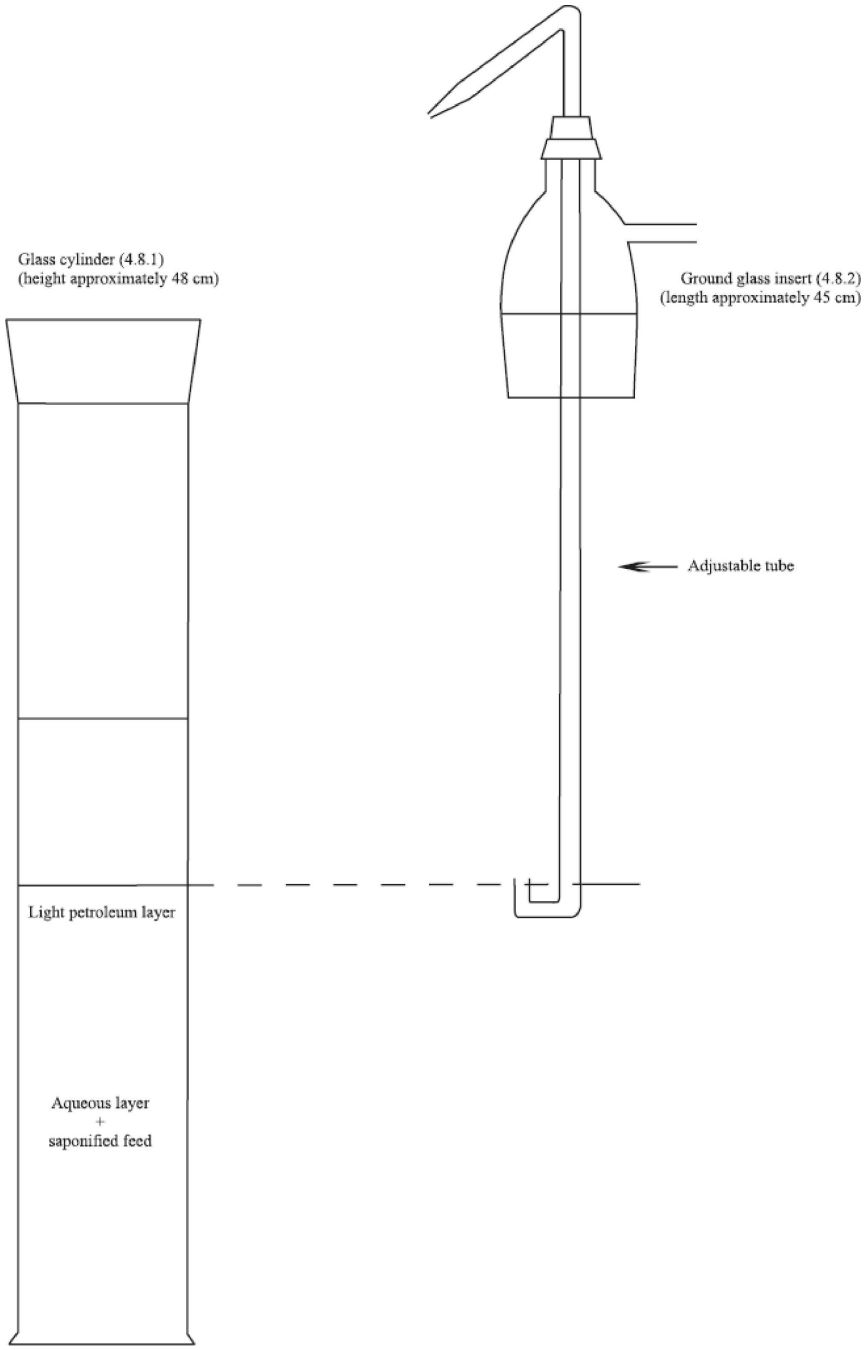
([2]) Πραγματοποιήθηκε από την ομάδα εργασίας για τις ζωοτροφές του Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: αριθμός εργαστηρίων
n: αριθμός μεμονωμένων τιμών
sr: τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
sR: τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
r: επαναληψιμότητα
R: αναπαραγωγιμότητα
CVr: συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας
CVR: συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

Σχήμα 1

Συσκευή εκχύλισης (σημείο 4.8)



Β. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17547 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε βιταμίνη A, E και D ([3]) — Μέθοδος καθαρισμού εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ή

— με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με τη χρήση φασματοφθορομετρικού ανιχνευτή (φθορισμού), όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 9 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

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

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

2. **Αρχή**

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

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Αιθανόλη, σ = 96 %.

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

3.3. Μεθανόλη.

3.4. Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, c = 50 g/100 ml.

3.5. Διάλυμα ασκορβικού νατρίου, c = 10 g/100 ml (βλέπε παρατήρηση σημείο 7.7).

3.6. Θειούχο νάτριο, $Na_2S \cdot x\ H_2O$ (x = 7-9).

3.6.1. Διάλυμα θειούχου νατρίου, c = 0,5 mol/l σε γλυκερόλη, β = 120 g/l (για x = 9) (βλέπε παρατήρηση στο σημείο 7.8).

3.7. Διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης, c = 2 g/100 ml σε αιθανόλη (σημείο 3.1).

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

3.9. Άζωτο, απαλλαγμένο οξυγόνου.

3.10. Οξική DL-α-τοκοφερόλη, εξαιρετικής καθαρότητας, πιστοποιημένης δραστικότητας

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

([3]) Η μέθοδος ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17547 αναφέρεται ως εναλλακτική μέθοδος που πρέπει να χρησιμοποιείται για επίσημους ελέγχους για τον προσδιορισμό της βιταμίνης A και E αντί της μεθόδου που περιγράφεται για τον προσδιορισμό της βιταμίνης A στο μέρος A του παρόντος παραρτήματος και για τη βιταμίνη E στο μέρος B του παρόντος παραρτήματος.

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

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

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

4. **Όργανα**

4.1. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου.

4.2. Αδιαφανή γυάλινα σκεύη.

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

4.2.2. Ογκομετρικές στενόλαιμες φιάλες με εσμυρισμένα πώματα των 10, 25, 100 και 500 ml.

4.2.3. Κωνικές διαχωριστικές χοάνες των 1 000 ml, με εσμυρισμένα πώματα.

4.2.4. Απιοειδείς φιάλες των 250 ml, με εσμυρισμένες υποδοχές.

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

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

4.5. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης.

4.5.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, C_{18}, με πλήρωση 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη.

4.5.2. Ανιχνευτής UV ή φθορισμού, με μεταβαλλόμενο μήκος κύματος.

4.6. Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες χαλαζία των 10 mm.

4.7. Υδατόλουτρο με μαγνητικό αναδευτήρα.

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

4.8.1. Γυάλινο κύλινδρο χωρητικότητας 1 l με εσμυρισμένο λαιμό και πώμα.

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

5. **Διαδικασία**

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

5.1. *Παρασκευή του δείγματος*

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

5.2. *Σαπωνοποίηση*

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

5.3. *Εκχύλιση*

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

5.3.1. Εκχύλιση με διαχωριστική χοάνη (σημείο 4.2.3)

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

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

5.3.2. Εκχύλιση με συσκευή εκχύλισης (σημείο 4.8)

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

Τα συνενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται όπως περιγράφεται στο σημείο 5.3.1 και ακολουθείται η περιγραφόμενη εκεί διαδικασία.

5.4. *Παρασκευή του δείγματος για την HPLC*

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

5.5. *Προσδιορισμός με HPLC*

Η βιταμίνη Ε διαχωρίζεται σε στήλη ανάστροφης φάσης C_{18} (σημείο 4.5.1) και μετράται η συγκέντρωση με τη βοήθεια ανιχνευτή φθορισμού (διέγερση: 295 nm, εκπομπή: 330 nm) ή UV (292 nm) (σημείο 4.5.2).

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

Συνθήκες HPLC

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

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

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

5.6.1. Πρότυπο οξικής DL-α-τοκοφερόλης

5.6.1.1. Παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εργασίας

Σε κωνική ή σφαιρική φιάλη με επίπεδο πυθμένα των 500 ml (σημείο 4.2.1) μεταφέρονται με σιφώνιο 25 ml του αρχικού διαλύματος οξικής DL-α-τοκοφερόλης (σημείο 3.10.1) και υδρολύεται όπως περιγράφεται στο σημείο 5.2. Ακολουθεί εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα (σημείο 3.2) σύμφωνα με το σημείο 5.3 και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή των 500 ml με πετρελαϊκό αιθέρα. 25 ml του εκχυλίσματος αυτού εξατμίζονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (βλέπε σημείο 5.4) σχεδόν μέχρι ξηρού, ο εναπομένων διαλύτης απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου (σημείο 3.9) και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 25,0 ml μεθανόλης (σημείο 3.3). Η ονομαστική συγκέντρωση αυτού του διαλύματος είναι 45,5 μg DL-α-τοκοφερόλης ανά ml, ισοδύναμη με 50 μg οξικής DL-α-τοκοφερόλης ανά ml. Το πρότυπο διάλυμα εργασίας πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

5.6.1.2. Παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και καμπύλη βαθμονόμησης

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

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

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

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

Το μέγιστο της απορρόφησης πρέπει να είναι στα 284 nm:

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

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

5.6.2. Πρότυπο DL-α-τοκοφερόλης

5.6.2.1. Παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εργασίας

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

5.6.2.2. Παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και καμπύλη βαθμονόμησης

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

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

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

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

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

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

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

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

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

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

όπου:

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

V_1 = όγκος του δείγματος (σημείο 5.4) σε ml

V_2 = όγκος της ποσότητας που λαμβάνεται σε (σημείο 5.4) σε ml

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Παρατηρήσεις**

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

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

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

7.4. Μετά τη φασματοφωτομετρική μέτρηση του διαλύματος της οξικής DL-α-τοκοφερόλης ή DL-α-τοκοφερόλης σύμφωνα με το σημείο 5.6.1.3 ή 5.6.2.3 αντιστοίχως, προστίθενται περίπου 10 mg BHT (σημείο 3.12) στο διάλυμα (σημείο 3.10.1 ή 3.10.2) και το διάλυμα διατηρείται σε ψυγείο (μέγιστος χρόνος αποθήκευσης τέσσερις εβδομάδες).

7.5. Αντί BHT, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδροκινόνη.

7.6. Χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης είναι εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλης.

7.7. Αντί διαλύματος ασκορβικού νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 150 mg ασκορβικού οξέος.

7.8. Αντί διαλύματος θειούχου νατρίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν περίπου 50 mg EDTA.

7.9. Η οξική βιταμίνη Ε υδρολύεται πολύ γρήγορα υπό αλκαλικές συνθήκες και επομένως είναι πολύ ευαίσθητη στην οξείδωση, ιδιαίτερα παρουσία ιχνοστοιχείων όπως ο σίδηρος ή ο χαλκός. Στην περίπτωση προσδιορισμού της βιταμίνης Ε σε προμείγματα, σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 5 000 mg/kg, μπορεί να προκύψει αποδόμηση της βιταμίνης Ε. Συνεπώς, για επιβεβαίωση, συνιστάται μια μέθοδος HPLC η οποία περιλαμβάνει ενζυματική χώνευση της σχηματιζόμενης βιταμίνης Ε χωρίς το βήμα της αλκαλικής σαπωνοποίησης.

8. **Επαναληψιμότητα**·

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

9. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης** ([4])

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

L: αριθμός εργαστηρίων

n: αριθμός μεμονωμένων τιμών

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

r: επαναληψιμότητα

R: αναπαραγωγιμότητα

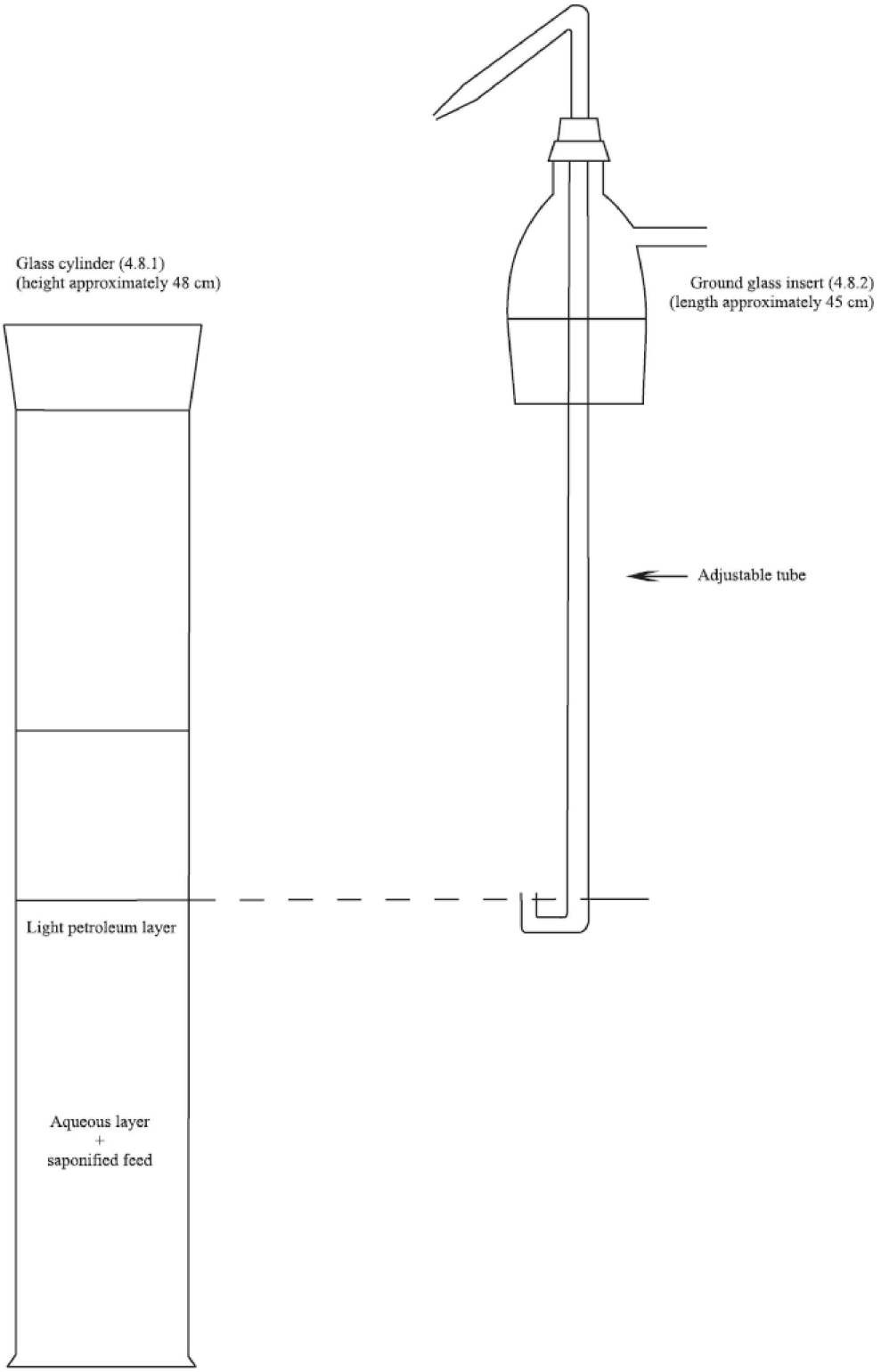
CV_r: συντελεστής μεταβλητότητας επαναληψιμότητας

CV_R: συντελεστής μεταβλητότητας αναπαραγωγιμότητας

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

Σχήμα 2

Συσκευή εκχύλισης (σημείο 4.8)



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

Η περιεκτικότητα σε σίδηρο, χαλκό, μαγγάνιο και ψευδάργυρο προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 15510 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου, κοβαλτίου, μολυβδαινίου, αρσενικού και μολύβδου με ICP-AES, ή

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 15621 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, θείου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου, και κοβαλτίου μετά από χώνευση υπό πίεση με ICP-AES, ή

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17053 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός ιχνοστοιχείων, βαρέων μετάλλων και άλλων στοιχείων με ICP-MS (μέθοδος πολλαπλών στοιχείων), ή

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN ISO 6869 Ζωοτροφές: Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ασβέστιο, χαλκό, σίδηρο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, κάλιο, νάτριο και ψευδάργυρο. μέθοδο που χρησιμοποιεί φασματομετρία ατομικής απορρόφησης, ή

— τη μέθοδος φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης φλόγας (AAS), όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 8 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και τομέας εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των ιχνοστοιχείων σιδήρου, χαλκού, μαγγανίου και ψευδαργύρου στις ζωοτροφές ([5]). Τα όρια προσδιορισμού είναι:

— σίδηρος (Fe): 20 mg/kg

— χαλκός (Cu): 10 mg/kg

— μαγγάνιο (Mn): 20 mg/kg

— ψευδάργυρος (Zn): 20 mg/kg

2. **Αρχή**

Το δείγμα διαλύεται σε υδροχλωρικό οξύ μετά την καταστροφή της οργανικής ύλης, αν υπάρχει. Τα στοιχεία σίδηρος, χαλκός, μαγγάνιο και ψευδάργυρος προσδιορίζονται, μετά από κατάλληλη αραίωση, με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

3. **Αντιδραστήρια**

Εισαγωγικές παρατηρήσεις

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

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

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

3.1. Υδροχλωρικό οξύ (d:1,19 g/ml).

3.2. Υδροχλωρικό οξύ (6 mol/litre).

3.3. Υδροχλωρικό οξύ (0,5 mol/litre).

3.4. Υδροφθορικό οξύ 38 μέχρι 40 % (κατ' όγκο) που έχει περιεκτικότητα σιδήρου λιγότερο από 1 mg Fe/lt και ίζημα μετά από εξάτμιση, λιγότερο από 10 mg (ως θειικό άλας)/lit.

([5]) Η μέθοδος αυτή έχει επικυρωθεί μέσω διεργαστηριακής δοκιμής για διάφορες μήτρες ζωοτροφών. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη διεύθυνση https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=el.

3.5. Θειικό οξύ. (d: 1,84 g/ml).

3.6. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (περίπου 100 όγκοι οξυγόνου 30 % κατά βάρος).

3.7. Πρότυπο διάλυμα σιδήρου (1 000 μg Fe/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο: διαλύεται 1 g σύρματος σιδήρουσε 200 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (σημείο 3.2), προστίθενται 16 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (σημείο 3.6) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.

3.7.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας σιδήρου (100 μg Fe/ml) που παρασκευάζεται με αραίωση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.7) με 9 μέρη νερό.

3.8. Πρότυπο διάλυμα χαλκού (1 000 μg Cu/ml) που παρασκευάζεται ως εξής ή ισοδύναμο διάλυμα διαθέσιμο στο εμπόριο:

— διαλύεται 1 g χαλκού υπό μορφή σκόνης σε 25 ml υδροχλωρικού οξέος 6 mol/litre (σημείο 3.2), προστίθενται 5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (σημείο 3.6) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο ενός λίτρου.

3.8.1. Πρότυπο διάλυμα εργασίας χαλκού (10 μg Cu/ml) παρασκευάζεται με αραίωση ενός μέρους του πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.8) με 9 μέρη νερό και συνέχεια με αραίωση ενός μέρους του προκύπτοντος διαλύματος με 9 μέρη νερό.

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

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

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

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

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

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

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

4. **'Οργανα**

4.1. Φούρνος με διαφράγματα με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και καταγραφικό.

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

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

5. **Διαδικασία** ([6])

5.1. *Δείγματα που περιέχουν οργανική ύλη*

5.1.1. Αποτέφρωση και παρασκευή του διαλύματος που θα αναλυθεί ([7])

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

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

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

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

Σημειώσεις:

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

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

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

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

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

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

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

5.1.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

5.1.2.1. Παρασκευή διαλυμάτων βαθμονόμησης

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

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

Σίδηρος

μg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (σημείο 3.7.1) (1 ml = 100 μg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (σημείο 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml.							

Χαλκός

μg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (σημείο 3.8.1) (1 ml = 10 μg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (σημείο 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Μαγγάνιο

μg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (σημείο 3.9.1) (1 ml = 10 μg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (σημείο 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml.							

Ψευδάργυρος

μg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml πρότυπου διαλύματος εργασίας (σημείο 3.10.1) (1 ml = 10 μg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (σημείο 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι όγκο 100 ml.							

5.1.2.2. Παρασκευή των διαλυμάτων για ανάλυση

Για τον προσδιορισμό του χαλκού, το διάλυμα που παρασκευάστηκε από το σημείο 5.1.1 μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί άμεσα. Αν απαιτείται να προσαρμοσθεί η συγκέντρωσή του μέσα στα όρια των διαλυμάτων βαθμονόμησης, μπορεί ένα μέρος του διαλύματος να μεταφερθεί με πιπέτα σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 ml και να συμπληρωθεί με 0,5 mol/litre υδροχλωρικό οξύ (σημείο 3.3) μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 100 ml.

Για τον προσδιορισμό του σιδήρου, μαγγανίου και ψευδαργύρου μεταφέρεται με πιπέτα ένα μέρος του διαλύματος που παρασκευάστηκε από το σημείο 5.1.1 μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, προστίθενται 10 ml διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11) και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με υδροχλωρικό οξύ 0,5 mol/litre (σημείο 3.3) (βλέπε επίσης σημείο 8 «Παρατήρηση»).

5.1.2.3. Τυφλό πείραμα

Το τυφλό πείραμα πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα προβλεπόμενα στάδια της διαδικασίας, παραλειπομένου του υλικού του δείγματος. Το διάλυμα βαθμονόμησης «0» δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως «τυφλό πείραμα».

5.1.2.4. Μέτρηση της ατομικής απορρόφησης

Μετράται η ατομική απορρόφηση των διαλυμάτων βαθμονόμησης και του διαλύματος που πρόκειται να αναλυθεί χρησιμοποιώντας μια οξειδωτική φλόγα αέρα-ακετυλενίου στα ακόλουθα μήκη κύματος:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Κάθε μέτρηση γίνεται τέσσερις φορές.

5.2. *Ανόργανες ζωοτροφές*

Αν το δείγμα δεν περιέχει οργανική ύλη, δεν είναι απαραίτητη προηγούμενη αποτέφρωση. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 5.1.1.1 αρχίζοντας από τη δεύτερη παράγραφο. Η εξάτμιση με υδροφθορικό οξύ μπορεί να παραλειφθεί.

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης, υπολογίζεται η συγκέντρωση του ιχνοστοιχείου στο δείγμα που αναλύεται και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε mg ιχνοστοιχείου ανά kg δείγματος (ppm).

7. **Επαναληψιμότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων προσδιορισμών, στο ίδιο δείγμα, από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— τα 5 mg/kg, κατ' απόλυτη τιμή, για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου μέχρι 50 mg/kg,

— το 10 % του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου από 50 και μέχρι 100 mg/kg,

— τα 10 mg/kg, με απόλυτη τιμή για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου 100 και μέχρι 200 mg/kg,

— το 5 % του μεγαλύτερου αποτελέσματος για περιεκτικότητες ιχνοστοιχείου ανώτερες από 200 mg/kg.

8. **Παρατήρηση**

Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων φωσφορικών αλάτων μπορεί να προκαλέσει παρεμβολές στον προσδιορισμό του σιδήρου, μαγγανίου και ψευδαργύρου. Αυτή η παρεμβολή πρέπει να διορθωθεί με την προσθήκη διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11). Αν όμως στο δείγμα ο λόγος βάρους Ca + Mg/P είναι > 2, η προσθήκη του διαλύματος χλωριούχου λανθανίου (σημείο 3.11) στο διάλυμα που θα αναλυθεί και στα διαλύματα βαθμονόμησης μπορεί να παραλειφθεί.

Δ. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΟΦΟΥΓΙΝΟΝΗΣ

Υδροβρωμική DL-trans-7-βρωμο-6-χλωρο-3-[3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ)-ακετονυλο]-κιναζολινόνη-4-(3H)

Η περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνης προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή—

— με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης με τη χρήση ανιχνευτή, όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 8 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλοφουγινόνης στις ζωοτροφές. Το όριο προσδιορισμού είναι 1 mg/kg.

2. **Αρχή**

Μετά από κατεργασία του δείγματος με θερμό νερό, η αλοφουγινόνη εκχυλίζεται ως ελεύθερη βάση σε οξικό αιθυλεστέρα και, κατόπιν, κατανέμεται ως υδροχλωρικό άλας σε υδατικό διάλυμα οξέος. Το εκχύλισμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Η περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνη προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), ανεστραμμένης φάσης, με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.2. Ρητίνη Amberlite XAD-2.

3.3. Οξικό αμμώνιο.

3.4. Οξικό αιθύλιο.

3.5. Οξικό οξύ, παγόμορφο.

3.6. Αλοφουγινόνη, πρότυπη ουσία (υδροβρωμική DL-trans-7-βρωμο-6-χλωρο-3-[3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ) ακετονυλο]-κιναζολινόνη-4-(3H), E 764).

3.6.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα αλοφουγινόνης, συγκεντρώσεως 100 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg αλοφουγινόνης (σημείο 3.6) και διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (σημείο 3.18). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και ακολουθεί ανάμειξη. Το διάλυμα αυτό διατηρείται σταθερό επί τρεις εβδομάδες στους 5 oC, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι.

3.6.2. Διαλύματα αναφοράς

Σε σειρά ογκομετρικών φιαλών των 100 ml, μεταφέρονται 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 και 6,0 ml από το αρχικό πρότυπο διάλυμα (σημείο 3.6.1). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα της κινούμενης φάσης (σημείο 3.21) και ακολουθεί ανάμειξη. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ είναι αντιστοίχως 1,0 μg/ml, 2,0 μg/ml, 3,0 μg/ml, 4,0 μg/ml και 6,0 μg/ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

3.7. Υδροχλωρικό οξύ (ρ_{20} περίπου 1,16 g/ml).

3.8. Μεθανόλη.

3.9. Νιτρικός άργυρος.

3.10. Ασκορβικό νάτριο.

3.11. Ανθρακικό νάτριο.

3.12. Χλωριούχο νάτριο.

3.13. EDTA (δινάτριο άλας του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος).

3.14. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.15. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου, c = 10 g/100 ml.

3.16. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου κορεσμένο σε χλωριούχο νάτριο, c = 5 g/100 ml

Διαλύονται σε νερό 50 g ανθρακικού νατρίου (σημείο 3.11). Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο και προστίθεται χλωριούχο νάτριο (σημείο 3.12) μέχρι κορεσμού.

3.17. Υδροχλωρικό οξύ περίπου 0,1 mol/l

10 ml HCl (σημείο 3.7) αραιώνονται με νερό μέχρι το 1 λίτρο.

3.18. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου περίπου 0,25 mol/l

Διαλύονται σε νερό (σημείο 3.14) 19,3 g οξικού αμμωνίου (σημείο 3.3) και 30 ml οξικού οξέος (σημείο 3.5) και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι το 1 λίτρο.

3.19. Προετοιμασία της ρητίνης Amberlite XAD-2

Κατάλληλη ποσότητα ρητίνης Amberlite (σημείο 3.2) εκπλύνεται με νερό μέχρι να απομακρυνθούν τελείως τα χλωριόντα, πράγμα που αποδεικνύεται με τη διεξαγωγή δοκιμής νιτρικού αργύρου (σημείο 3.20) στην απορριπτόμενη υδατική φάση. Στη συνέχεια, η ρητίνη εκπλύνεται με 50 ml μεθανόλης (σημείο 3.8), απορρίπτεται η μεθανόλη και η ρητίνη φυλάσσεται σε ανανεωμένη μεθανόλη.

3.20. Διάλυμα νιτρικού αργύρου περίπου 0,1 mol/l

Διαλύονται 0,17 g νιτρικού αργύρου (σημείο 3.9) σε 10 ml νερού.

3.21. Κινητή φάση για τη χρωματογραφία HPLC

Αναμειγνύονται 500 ml ακετονιτριλίου (σημείο 3.1) με 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου (σημείο 3.18) και 1 200 ml νερού (σημείο 3.14). Ρυθμίζεται το pH στην τιμή 4,3 με τη βοήθεια οξικού οξέος (σημείο 3.5). Ακολουθεί διήθηση μέσω φίλτρου 0,22 μm (σημείο 4.8) και απαερίωση του διαλύματος (π.χ. με υπερήχους για 10 λεπτά). Το διάλυμα αυτό διατηρείται σταθερό επί έναν μήνα, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι σε κλειστό δοχείο.

4. **Όργανα**

4.1. Λουτρό υπερήχων.

4.2. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου.

4.3. Μηχανή φυγοκέντρησης.

4.4. Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με συστοιχία διόδων ως ανιχνευτή.

4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με πληρωτικό υλικό C_{18} πάχους 10 μm ή ισοδύναμη.

4.5. Γυάλινη στήλη (διαστάσεων 300 mm × 10 mm) εφοδιασμένη με ηθμό από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα.

4.6. Ηθμοί από υαλοβάμβακα, διαμέτρου 150 mm.

4.7. Φίλτρα μεμβράνης, 0,45 μm.

4.8. Φίλτρα μεμβράνης, 0,22 μm.

5. **Διαδικασία**

Σημείωση: Η αλοφουγινόνη ως ελεύθερη βάση είναι ασταθής σε αλκαλικά διαλύματα και διαλύματα οξικού αιθυλεστέρα. Δεν πρέπει να παραμένει μέσα σε οξικό αιθυλεστέρα περισσότερο από 30 λεπτά.

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σ' αυτό αλοφουγινόνη ή παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναληφθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής, το οποίο θα έχει εμπλουτισθεί με ποσότητα αλοφουγινόνης όμοια με αυτήν που υπάρχει στο προς ανάλυση δείγμα. Για τον εμπλουτισμό σε επίπεδο 3 mg/Kg προστίθενται 300 μl από το αρχικό πρότυπο διάλυμα (σημείο 3.6.1) σε 10 g τυφλού δείγματος ζωοτροφής και αφού αναμειχθεί αφήνεται δέκα λεπτά πριν από το επόμενο στάδιο της εκχύλισης (σημείο 5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με το δείγμα και δεν πρέπει να ανιχνεύεται αλοφουγινόνη.

5.2. *Εκχύλιση*

Σε σωλήνα φυγοκέντρου των 200 ml, ζυγίζονται 10 g του παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,1 g και προστίθενται 0,5 g ασκορβικού νατρίου (σημείο 3.10), 0,5 g EDTA (σημείο 3.13) και 20 ml νερού. Το σύνολο αναμειγνύεται και ο σωλήνας τοποθετείται επί 5 λεπτά σε υδατόλουτρο (80 °C). Αφού ψυχθεί μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 20 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου (σημείο 3.15) και ακολουθεί ανάμειξη. Προστίθενται αμέσως 100 ml οξικού αιθυλεστέρα (σημείο 3.4) και το σύνολο αναδεύεται ζωηρά επί 15 δευτερόλεπτα με το χέρι. Στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται επί τρία λεπτά στο λουτρό υπερήχων (σημείο 4.1) και χαλαρώνεται το πώμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση επί δύο λεπτά. Η στιβάδα του οξικού αιθυλεστέρα αποχύνεται, μέσω ηθμού από υαλοβάμβακα (σημείο 4.6), μέσα σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση του δείγματος με νέα ποσότητα 100 ml οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα ενώνονται, εκπλύνονται επί ένα λεπτό με 50 ml διαλύματος ανθρακικού νατρίου κορεσμένου με χλωριούχο νάτριο (σημείο 3.16) και η υδατική στιβάδα απορρίπτεται.

Η οργανική στιβάδα υποβάλλεται σε εκχύλιση επί ένα λεπτό με 50 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.17). Η υποκείμενη στιβάδα του οξέος συλλέγεται γρήγορα σε διαχωριστική χοάνη των 250 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της οργανικής στιβάδας επί 1,5 λεπτό με νέα ποσότητα 50 ml υδροχλωρικού οξέος και τα δύο εκχυλίσματα ενώνονται. Εκπλύνονται με περιδίνηση επί δέκα δευτερόλεπτα περίπου με 10 ml οξικού αιθυλεστέρα (σημείο 3.4).

Η υδάτινη στιβάδα μεταγγίζεται ποσοτικά σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, ενώ η οργανική στιβάδα απορρίπτεται. Η εναπομένουσα ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα εξατμίζεται πλήρως από το διάλυμα του οξέος σε περιστρεφόμενο εξατμιστή υμενίου (σημείο 4.2). Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 40 °C. Αν η συσκευή βρίσκεται υπό κενό περίπου 25 mbar και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 38 °C, όλη η εναπομένουσα ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα απομακρύνεται σε πέντε λεπτά.

5.3. *Καθαρισμός*

5.3.1. Παρασκευή της στήλης Amberlite

Παρασκευάζεται μία στήλη XAD-2 για κάθε εκχύλισμα δείγματος. Με τη βοήθεια μεθανόλης (σημείο 3.8) φέρονται σε γυάλινη στήλη (σημείο 4.5) 10 g έτοιμης προς χρήση Amberlite (σημείο 3.19). Στην άνω επιφάνεια της ρητίνης τοποθετείται μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα. Η μεθανόλη απορροφάται από τη στήλη και η ρητίνη εκπλύνεται με 100 ml νερού, μέχρι το υγρό να φθάσει στην άνω επιφάνεια της ρητίνης, οπότε διακόπτεται η ροή. Πριν χρησιμοποιηθεί, η στήλη αφήνεται σε ηρεμία επί δέκα λεπτά για να αποκατασταθεί ισορροπία. Η στήλη δεν πρέπει ποτέ να αφήνεται να ξηρανθεί.

5.3.2. Καθαρισμός του δείγματος

Το εκχύλισμα (σημείο 5.2) μεταγγίζεται ποσοτικά στο άνω μέρος της έτοιμης προς χρήση στήλης Amberlite (σημείο 5.3.1) και ακολουθεί έκλουση με απόρριψη του εκλούσματος. Η ταχύτητα έκλουσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 ml/min. Η σφαιρική φιάλη εκπλύνεται με 20 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.17) και το έκπλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την έκπλυση της ρητινικής στήλης. Στα τυχόν υπολείμματα διαλύματος του οξέος διοχετεύεται ρεύμα αέρος. Τα υγρά της έκπλυσης απορρίπτονται. Προστίθενται στη στήλη 100 ml μεθανόλης (σημείο 3.8) και αφήνονται να εκρεύσουν 5-10 ml και το έκλουσμα συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml. Η εναπομένουσα μεθανόλη αφήνεται σε ηρεμία επί δέκα λεπτά για να αποκατασταθεί ισορροπία με τη ρητίνη και συνεχίζεται η έκλουση με ταχύτητα όχι μεγαλύτερη από 20 ml/min, ενώ το έκλουσμα συλλέγεται στην ίδια σφαιρική φιάλη. Η μεθανόλη εξατμίζεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστή υμενίου (σημείο 4.2), θερμαινόμενο σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία δεν πρέπει αν υπερβαίνει τους 40 °C. Το υπόλειμμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 10ml με τη βοήθεια του διαλύματος της κινούμενης φάσης (σημείο 3.21). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με την κινούμενη φάση και το σύνολο αναμειγνύεται. Μια ορισμένη ποσότητα διηθείται διαμέσου διηθητικής μεμβράνης (σημείο 4.7). Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (σημείο 5.4).

5.4. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.4.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες συνθήκες δίδονται μόνο ως οδηγός. Άλλες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, υπό την προϋπόθεση να δίδουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Στήλη αναλυτικής χρωματογραφίας (σημείο 4.4.1)

Κινητή φάση για την HPLC (σημείο 3.21)

Ρυθμός ροής: 1,5 έως 2 ml/min

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 243 nm

Όγκος έγχυσης: 40 έως 100 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.6.2) που περιέχει 3,0 μg/ml, μέχρι να επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Γράφημα βαθμονόμησης

Κάθε διάλυμα αναφοράς (σημείο 3.6.2) εισάγεται πολλές φορές στη στήλη και μετρώνται τα ύψη (ή τα εμβαδά) των κορυφών που αντιστοιχούν σε κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Το εκχύλισμα του δείγματος (σημείο 5.3.2), σε όγκο ίσο με εκείνου που έχει χρησιμοποιηθεί για τα διαλύματα αναφοράς, εισάγεται πολλές φορές στη στήλη και υπολογίζεται η μέση τιμή των υψών ή των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στην αλοφουγινόνη.

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Από τις μέσες τιμές των υψών (εμβαδών) των κορυφών που αντιστοιχούν στην αλοφουγινόνη του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του σε μg/ml με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (σημείο 5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε αλοφουγινόνη κατά βάρος (mg/kg) παρέχεται από τον τύπο:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

όπου:

c: συγκέντρωση αλοφουγινόνης στο διάλυμα δείγματος σε μg/ml,

m: το βάρος του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της ελεγχόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογράφηση ή με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών, με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.6.2) με συγκέντρωση 6,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Το εκχύλισμα δείγματος εμπλουτίζεται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.6.2). Η ποσότητα της προστιθέμενης αλοφουγινόνης πρέπει να είναι παραπλήσια με την υπολογισθείσα ποσότητα της ουσίας στο εκχύλισμα του δείγματος.

Πρέπει να προκύψει ενίσχυση μόνο του ύψους της κορυφής που αντιστοιχεί στην αλοφουγινόνη, αφού ληφθεί υπόψη και το ποσό που προστέθηκε και η αραίωση του εκχυλίσματος. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ του μέγιστου ύψους της δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από ± 10 % του αρχικού εύρους.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Για την ανίχνευση σε συστοιχία διόδων λυχνιών, το όριο αυτό είναι συνήθως ± 2 nm.

β) μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων ποσοτικών προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 mg/kg, για περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνη 3 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Για το εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, ο βαθμός ανάκτησης πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Εκπονήθηκε διεργαστηριακή μελέτη ([8]), κατά την οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση τρία δείγματα σε οκτώ εργαστήρια.

Αποτελέσματα

	Δείγμα Α (τυφλό) Κατά την παραλαβή	Δείγμα Β (Σιμιγδάλια)		Δείγμα Γ (Σύμπηκτα)	
		Κατά την παραλαβή	Μετά από δύο μήνες	Κατά την παραλαβή	Μετά από δύο μήνες
Μέσος όρος [mg/kg]	ΔΑ	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ΔΑ = δεν ανιχνεύεται

S_R= τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R= συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας (%)

Rec.= ανάκτηση (%)

Ε. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΟΒΕΝΙΔΙΝΗΣ

Υδροχλωρική 1,3-δις[(4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο] γουανιδίνη

Η περιεκτικότητα σε σαλινομυκίνη προσδιορίζεται με

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή—

— με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης με τη χρήση ανιχνευτή, όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 8 κατωτέρω.

([8]) The Analyst 108, 1983, σ. 1252 έως 1256

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της ροβενιδίνης στις ζωοτροφές. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού είναι 5mg/kg.

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Το εκχύλισμα ξηραίνεται και μέρος αυτού υποβάλλεται σε καθαρισμό πάνω σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Η ροβενιδίνη εκλούεται από τη στήλη με μεθανόλη και φέρεται στον κατάλληλο όγκο με κινητή φάση. Η περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη προσδιορίζεται με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) ανάστροφης φάσης με τη βοήθεια ανιχνευτού υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Μεθανόλη.

3.2. Οξυνισμένη μεθανόλη

Εντός βαθμονομημένης φιάλης των 500 ml εισάγονται 4,0 ml υδροχλωρικού οξέος ($\rho 20$ = 1,18 g/ml), προστίθεται μεθανόλη (σημείο 3.1) μέχρι τη χαραγή και το περιεχόμενο αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευασθεί λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

3.3. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.4. Μοριακό κόσκινο

Σφαιρίδια τύπου 3A, 8 έως 12 βρόχων (διάμετρος σφαιριδίων 1,6-2,5 mm, κρυσταλλικό πυριτικό αργίλιο, διάμετρος πόρων 0,3 nm).

3.5. Οξείδιο του αργιλίου: όξινο, βαθμού ενεργότητας I για χρωματογραφία στήλης

Εισάγουμε 100 g οξειδίου του αργιλίου σε κατάλληλο δοχείο και προσθέτουμε 2,0 ml νερού. Πωματίζουμε και ανακινούμε επαρκώς επί 20 λεπτά. Φυλάσσουμε το διάλυμα σε καλά πωματισμένο δοχείο.

3.6. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου, συγκεντρώσεως 0,025 mol/l

Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,40 g δισόξινου φωσφορικού καλίου εντός βαθμονομημένης φιάλης των 1 000 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.7. Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου, συγκεντρώσεως 0,025 mol/l

Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,55 g άνυδρου (ή 4,45 g δις ένυδρου ή 8,95 g δωδεκάκις ένυδρου) μονόξινου φωσφορικού νατρίου εντός βαθμονομημένης φιάλης του 1 λίτρου, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.8. Κινητή φάση HPLC

Αναμειγνύουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

650 ml ακετονιτριλίου (σημείο 3.3),

250 ml νερού (καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC),

50 ml διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (σημείο 3.6),

50 ml διαλύματος μονόξινου φωσφορικού νατρίου (σημείο 3.7).

Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης πάχους 0,22 μm (σημείο 4.6) και απομακρύνονται τα αέρια (π.χ. με έκθεση σε υπερήχους επί 10 λεπτά).

3.9. Πρότυπη ουσία

Καθαρή ροβενιδίνη: Υδροχλωρική 1,3-δις[(4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο] γουανιδίνη

3.9.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 300 μg/ml

Ζυγίζουμε 30 mg της πρότυπης ουσίας (σημείο 3.9) με ακρίβεια 0,1 mg. Διαλύουμε σε οξινισμένη μεθανόλη (σημείο 3.2) εντός βαθμονομημένης φιάλης των 100 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και αναμειγνύουμε. Περιτυλίσσουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.

3.9.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 12 μg/ml

Μεταφέρουμε 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.9.1) εντός βαθμονομημένης φιάλης των 250 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (σημείο 3.8) και αναμειγνύουμε. Περιτυλίσσουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.

3.9.3. Διαλύματα αναφοράς

Μεταφέρουμε 5,0 ml 10,0 ml, 15,0 ml, 20,0 ml και 25,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.9.2) σε βαθμονομημένες φιάλες των 50 ml. Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (σημείο 3.8) και αναμειγνύουμε. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε ροβενιδίνη είναι αντιστοίχως 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 και 6,0 μg/ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

3.10. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

4. **'Οργανα**

4.1. Υάλινη στήλη

Υάλινη στήλη φαιοκίτρινου χρώματος (όπως το χρώμα του ηλέκτρου), εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με δεξαμενή χωρητικότητας 150 ml περίπου, εσωτερικής διαμέτρου 10-15 mm και μήκους 250 mm.

4.2. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας.

4.3. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου.

4.4. Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με αντιστοιχία διόδιων ως ανιχνευτή η οποία να λειτουργεί στην περιοχή 250-400 nm

4.4.1. Υγρή χρωματογραφική στήλη: 300 mm × 4 mm, C_{18}, 10 m πλήρωση, ή ισοδύναμη.

4.5. Διηθητικός χάρτης από ίνες υάλου (Whatman GF/A ή άλλου ισοδύναμου τύπου).

4.6. Φίλτρα μεμβράνης, 0,22 μm.

4.7. Φίλτρα μεμβράνης, 0,45 μm.

5. **Διαδικασία**

Σημείωση: Η ροβενιδίνη είναι ευαίσθητη στο φως. Πρέπει σε όλες τις ενέργειες να χρησιμοποιούνται υάλινα σκεύη φαιοκίτρινου χρώματος.

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σε αυτό ούτε ροβενιδίνη ούτε άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής (σημείο 5.1.1) το οποίο θα έχει προηγουμένως εμπλουτιστεί με ποσότητα ροβονιδίνης παραπλήσια εκείνης του δείγματος. Για εμπλουτισμό μέχρι 60 mg/kg, μεταφέρουμε 3,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.9.1) σε κωνική φιάλη των 250 ml. Εξατμίζουμε το διάλυμα υπό ρεύμα αζώτου μέχρις ότου απομείνουν περί τα 0,5 ml. Προσθέτουμε 15 g του τυφλού δείγματος, αναμειγνύουμε και αναμένουμε επί 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στην εκχύλιση (σημείο 5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς αυτής της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου προς εκείνον του δείγματος και κατά την ανάλυση δεν πρέπει να ανιχνεύεται ροβενιδίνη.

5.2. *Εκχύλιση*

Ζυγίζονται περί τα 15 g που παρασκευασθέντος δείγματος με προσέγγιση 0,01 g. εισάγονται σε κωνική φιάλη των 250 ml όπου και προστίθενται 100,0 ml οξινισμένης μεθανόλης (σημείο 3.2). Πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται επί μία ώρα με τον αναδευτήρα (σημείο 4.2). Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη από ίνες υάλου (σημείο 4.5) και το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 150 ml. Προστίθενται 7,5 g από μοριακό κόσκινο (σημείο 3.4), πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται το περιεχόμενο επί 5 λεπτά. Το διάλυμα διηθείται μέσω ηθμού υαλοϊνών. Το εν λόγω διάλυμα κρατιέται για το στάδιο καθαρισμού (σημείο 5.3).

5.3. *Καθαρισμός*

5.3.1. Προετοιμασία της στήλης οξειδίου και αργιλίου

Μικρό βύσμα υαλοβάμβακος τοποθετείται στο κάτω μέρος μιας υάλινης στήλης (σημείο 4.1) και συμπιέζεται με τη βοήθεια υάλινης ράβδου. Ζυγίζονται 11,0 g του παρασκευασθέντος οξειδίου του αργιλίου (σημείο 3.5) και μεταφέρονται στη στήλη. Λαμβάνεται φροντίδα ώστε κατά το στάδιο αυτό η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα να περιορισθεί στο ελάχιστο. Χτυπάμε ελαφρά τη στήλη από το κάτω μέρος της ώστε να κατακαθίσει το οξείδιο του αργιλίου.

5.3.2. Καθαρισμός δείγματος

Με ένα σιφώνιο εισάγονται στη στήλη 5,0 ml από το εκχύλισμα που ελήφθη στο σημείο 5.2. Φέρεται στο άκρο του σιφωνίου πλησίον του τοιχώματος της στήλης και το διάλυμα αφήνεται να απορροφηθεί από το οξείδιο του αργιλίου. Εκλούεται η ροβενιδίνη από τη στήλη με 100 ml μεθανόλης (σημείο 3.1) σε ρυθμό ροής 2-3 ml/min και συλλέγεται το υγρό της έκλουσης σε σφαιρική φιάλη των 250 ml. Το διάλυμα μεθανόλης εξατμίζεται μέχρι πλήρους ξήρανσης σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα υμενίου (σημείο 4.3). Το υπόλειμμα διαλύεται εκ νέου σε 3-4 ml κινητής φάσης (σημείο 3.8) και μεταφέρεται ποσοτικά σε βαθμονομημένη φιάλη των 10 ml. Η φιάλη εκπλύνεται επανειλημμένως με 1-2 ml κινητής φάσης κάθε φορά και τα υπολείμματα των εκπλύσεων μεταφέρονται στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται ο ίδιος διαλύτης στη βαθμονομημένη φιάλη μέχρι τη χαραγή και το περιεχόμενο της φιάλης αναμειγνύεται. Κατάλληλη ποσότητα διηθείται μέσω φίλτρου 0,45 μm (σημείο 4.7). Το εν λόγω διάλυμα φυλάσσεται για τον προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (σημείο 5.4).

5.4. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.4.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα:

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (σημείο 4.4.1),

Κινητή φάση HPLC (σημείο 3.8),

Ρυθμός ροής: 1,5 έως 2 ml/λεπτό,

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 317 nm

Όγκος έγχυσης: 20 έως 50 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα της χρωματογραφικής διάταξης με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.9.3) συγκεντρώσεως 3,6 μg/ml έως ότου επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Γράφημα βαθμονόμησης

Εισάγεται κατ' επανάληψη καθένα από τα διαλύματα αναφοράς (σημείο 3.9.3) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών (εμβαδά) για κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς με τεταγμένες τις μέσες τιμές του ύψους των κορυφών ή τις μέσες τιμές των εμβαδών και με τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg ανά ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Εισάγεται κατ' επανάληψη στη στήλη το εκχύλισμα του δείγματος (σημείο 5.3.2) σε όγκο ίσο με εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) των κορυφών που αντιστοιχούν στη ροβενιδίνη.

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του δείγματος σε μg/ml με βάση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της ροβενιδίνης του διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (σημείο 5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ροβενιδίνη κατά βάρος (mg/kg) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

όπου:

c = συγκέντρωση της ροβενιδίνης στο διάλυμα του δείγματος, σε μg/ml

m = το βάρος του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή διά χρησιμοποιήσεως συστοιχίας διόδων ως ανιχνευτή διά του οποίου γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.9.3) συγκεντρώσεως 6 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα του δείγματος εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.9.3). Η ποσότητα της προστιθέμενης ροβενιδίνης πρέπει να είναι παραπλήσια προς την κατ' εκτίμηση υπολογιζόμενη ποσότητα ροβενιδίνης στο εκχύλισμα του δείγματος.

Αν συνεκτιμηθούν τόσο η ποσότητα που προστέθηκε όσο και η αραίωση του εκχυλίσματος, πρέπει να σημειωθεί ενίσχυση μόνον της κορυφής που αντιστοιχεί στη ροβενιδίνη. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να παρεκλίνει περισσότερο από 10 % του αρχικού πλάτους.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Για ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό είναι περίπου 2 nm.

β) μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλα διενεργούμενων ποσοτικών προσδιορισμών επί του ιδίου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του αποτελέσματος με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη μεγαλύτερη από 15 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 85 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Διοργανώθηκε συνεργατική μελέτη σε επίπεδο ΕΕ, στην οποία αναλύθηκαν τέσσερα δείγματα ζωοτροφών πουλερικών και κουνελιών, σε γεύματα ή συσσωματωμένα σε μορφή σβόλων από 12 εργαστήρια.. Η ανάλυση του κάθε δείγματος έγινε εις διπλούν. Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Πουλερικά		Κουνέλια	
	Άλευρο	Σύμπηκτα	Άλευρο	Σύμπηκτα
Μέσος όρος [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66

CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Ανάκτηση [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

s_r = συντελεστής μεταβλητότητας της επαναληψιμότητας, %

s_r = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας, %

ΣΤ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DICLAZURIL

(+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5-τετραϋδρο-3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2-υλο) φαινυλ]ακετονιτρίλιο

Η περιεκτικότητα σε diclazuril προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— με σύστημα τριών διαλυτών βαθμωτής έκλουσης υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης με τη χρήση ανιχνευτή, όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 9 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του diclazuril σε ζωοτροφές και προμείγματα ([9]). Το όριο ανίχνευσης είναι 0,1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 0,5 mg/kg. Χαμηλότερα όρια ποσοτικού προσδιορισμού είναι εφικτά, αλλά αυτό πρέπει να επικυρωθεί από τον χρήστη.

2. **Αρχή**

Μετά από προσθήκη εσωτερικού προτύπου, το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Στις ζωοτροφές, κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος καθαρίζεται σε φυσίγγιο εκχύλισης στερεάς φάσης C18. Το diclazuril εκλούεται από το φυσίγγιο με μείγμα οξινισμένης μεθανόλης και νερού. Έπειτα από εξάτμιση, το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Στα προμείγματα, το εκχύλισμα εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε DMF/νερό. Η περιεκτικότητα σε diclazuril προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσης τριών διαλυμάτων βαθμωτής έκλουσης με χρήση ανιχνευτή UV.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.2. Οξικό αμμώνιο.

3.3. Όξινο θειικό τετραβουτυλαμμώνιο (TBHS).

3.4. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.5. Μεθανόλη καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.6. N, N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF).

3.7. Υδροχλωρικό οξύ, ρ_{20} 1,19 g/ml.

3.8. Πρότυπος ουσία: diclazuril: (+)-4-χλωροφαινυλο[2,6-διχλωρο-4-(2,3,4,5τετραϋδρο– 3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2-υλο) φαινυλ] ακετονιτρίλιο εγγυημένης καθαρότητας

([9]) Η μέθοδος μπορεί επίσης να εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του diclazuril σε πρώτες ύλες ζωοτροφών.

3.8.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα diclazuril, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg πρότυπης ουσίας diclazuril (σημείο 3.8). Διαλύονται σε DMF (σημείο 3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (σημείο 3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία 4 °C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα ([10]).

3.8.2. Πρότυπο διάλυμα diclazuril, 50 μg/ml

5,00 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.8.1) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (σημείο 3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία 4 °C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.9. Ουσία εσωτερικού προτύπου: 2,6 διχλωρο-α-(4-χλωροφαινυλο)-4-(4,5 διυδρο– 3,5-διοξο-1,2,4-τριαζιν-2(3H)-υλο)α-μεθυλοβενζολο-ακετονιτρίλιο

3.9.1. Αρχικό διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 500 μg/ml.

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 25 mg ουσίας εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9). Διαλύονται σε DMF (σημείο 3.6), συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με DMF (σημείο 3.6) και αναμειγνύονται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία 4 °C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.9.2. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου, 50 μg/ml.

5,00 ml του αρχικού διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.1) μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF (σημείο 3.6) και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία 4°C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.9.3. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου για προμείγματα, p/1 000 mg/ml (p = ονομαστική περιεκτικότητα diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg ρ/10 mg της ουσίας εσωτερικού προτύπου, διαλύονται σε DMF (σημείο 3.6) σε λουτρό υπερήχων (σημείο 4.7), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με DMF και αναμειγνύεται. Η φιάλη περιτυλίσσεται με φύλλο αλουμινίου ή χρησιμοποιείται σκουρόχρωμη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο. Σε θερμοκρασία 4 °C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.10. Διαλύματα αναφοράς

3.10.1. Διάλυμα βαθμονόμησης, 1 μg/ml (diclazuril)

1,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (σημείο 3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 17 ml DMF (σημείο 3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

3.10.2. Διάλυμα βαθμονόμησης, 2 μg/ml (diclazuril)

2,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (σημείο 3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 16 ml DMF (σημείο 3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν από τη χρήση του.

3.10.3. Διάλυμα βαθμονόμησης, 3 μg/ml (diclazuril)

3,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (σημείο 3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 15 ml DMF (σημείο 3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

([10]) Μεγαλύτερη σταθερότητα (έως 1 έτος) μπορεί να είναι δυνατή, αλλά πρέπει να επιβεβαιωθεί από το κάθε εργαστήριο.

3.10.4. Διάλυμα βαθμονόμησης, 4 μg/ml (diclazuril)

4,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (σημείο 3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 14 ml DMF (σημείο 3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

3.10.5. Διάλυμα βαθμονόμησης, 5 μg/ml (diclazuril)

5,00 ml πρότυπου διαλύματος diclazuril (σημείο 3.8.2) και 2,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) μεταφέρονται με σιφώνιο σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 13 ml DMF (σημείο 3.6), το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύεται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

Σημείωση: Τα διαλύματα βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) καλύπτουν τη συγκέντρωση diclazuril στις ζωοτροφές που κυμαίνεται από 0,5 έως 2,5 mg/kg κατά τη χρήση του ισχύοντος πρωτοκόλλου.

3.11. Στήλη εκχύλισης στερεάς φάσεως C_{18}, π.χ. Bond Elut, μέγεθος: 20 cc, προσροφητικό βάρος: 5 000 mg (προετοιμασία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του προμηθευτή).

3.12. Διαλύτης εκχύλισης: οξινισμένη μεθανόλη

5,0 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.7) φέρονται με σιφώνιο σε 1 000 ml μεθανόλης (σημείο 3.5), και αναμειγνύονται.

3.13. Κινητή φάση για HPLC

3.13.1. Υγρό έκλουσης Α: διάλυμα οξικού αμμωνίου-όξινου θειικού τετραβουτυλαμμωνίου.

5 g οξικού αμμωνίου (σημείο 3.2) και 3,4 g TBHS (σημείο 3.3) διαλύονται σε 1 000 ml νερού (σημείο 3.1) και αναμειγνύονται.

3.13.2. Υγρό έκλουσης Β: ακετονιτρίλιο (σημείο 3.4).

3.13.3. Υγρό έκλουσης Γ: μεθανόλη (σημείο 3.5).

4. **Όργανα**

4.1. Μηχανικός αναδευτήρας.

4.2. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα τριών διαλυτών βαθμωτής έκλουσης:

4.2.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, Hypersil ODS, 3 μm, 100 mm × 4,6 mm ή ισοδύναμη.

4.2.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων.

4.3. Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου.

4.4. Φίλτρο μεμβράνης (π.χ. χημικώς ανθεκτικό νάιλον), 0,45 μm.

4.5. Σύριγγα μιας χρήσης των 5 ml.

4.6. Πολλαπλή κενού (vacuum manifold).

4.7. Λουτρό υπερήχων.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Τυφλό

Πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε diclazuril ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό diclazuril ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη μιας ποσότητας diclazuril, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 1 mg/kg, 0,1 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.8.1) προστίθενται σε 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (σημείο 5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε σημείο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα diclazuril παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. *Εκχύλιση*

5.2.1. Σύνθετες ζωοτροφές

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g περίπου 50 g του δείγματος. Μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθενται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.2) και 200 ml διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.12) και η φιάλη πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης (σημείο 4.1) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Αφήνεται να κατακαθίσει για 10 λεπτά. Ποσότητα 20 ml του υπερκείμενου υγρού μεταφέρεται σε κατάλληλο γυάλινο δοχείο και αραιώνεται με 20 ml νερό (σημείο 3.1). Το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε φυσίγγιο εκχύλισης (σημείο 3.11), και διέρχεται με εφαρμογή κενού (σημείο 4.6). Η στήλη εκπλένεται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.12) και νερού (σημείο 3.1), 65 + 35 (V + V). Τα συλλεγόμενα κλάσματα απορρίπτονται και οι απομένουσες ουσίες εκλούονται με 25 ml μείγματος διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.12) και νερού, 80 + 20 (V + V). Το κλάσμα αυτό εξατμίζεται μέχρι ξηρού σχεδόν με τη βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα (σημείο 4.3) στους 60 oC. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1,0 ml DMF (σημείο 3.6), προστίθεται 1,5 ml νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί διήθηση μέσω μεμβράνης (σημείο 4.4) και κατόπιν ο προσδιορισμός με HPLC (σημείο 4.5). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.2.2. Προμείγματα

Ζυγίζεται με ακρίβεια 0,001 g περίπου 1 g του δείγματος. Μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 500 ml, προστίθεται 1,00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (σημείο 3.9.3), 200 ml διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.12) και η φιάλη πωματίζεται. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή μηχανικής ανακίνησης (σημείο 4.1) καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας. Αφήνεται να κατακαθίσει για 10 λεπτά. Ποσότητα 10 000/p ml (p = ονομαστική περιεκτικότητα του diclazuril στο πρόμειγμα σε mg/kg) του υπερκειμένου υγρού μεταφέρεται σε φιάλη στρογγυλού πυθμένα με κατάλληλο μέγεθος. Το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση στους 60 oC με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (σημείο 4.3). Το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 10,0 ml DMF (σημείο 3.6), προστίθενται 15,0 ml νερό (σημείο 3.1) και αναμειγνύονται. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.3. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

— Υγρή χρωματογραφική στήλη (σημείο 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, 3 μm ή ισοδύναμη

— Κινητή φάση

  — Υγρό έκλουσης A (σημείο 3.13.1): υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και όξινου θειικού τετραβουτυλαμμωνίου.

  — Υγρό έκλουσης B (σημείο 3.13.2): ακετονιτρίλιο.

  — Υγρό έκλουσης C (σημείο 3.13.3): μεθανόλη.

— Τρόπος έκλουσης — γραμμική κλίση

  — αρχική κατάσταση A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)·

  — μετά από κλίση 10 λεπτών εκλούσεως επί 30 λεπτά προς: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)·

  — πλήρωση με B για 10 λεπτά.

— Ρυθμός ροής: 1,5-2 ml/min.

— Όγκος έγχυσης: 20 μl.

— Μήκος κύματος ανίχνευσης: 280 nm.

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα βαθμονόμησης (σημείο 3.10.2) που περιέχει 2 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Χρωματογραφική ανάλυση των διαλυμάτων βαθμονόμησης

Εισάγονται 20 μl των διαλυμάτων βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) δύο φορές το καθένα, ταυτοποιούνται και ενοποιούνται οι κορυφές του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου και χαράσσεται η καμπύλη βαθμονόμησης με βάση τον λόγο του μέσου ύψους ή εμβαδού των κορυφών του diclazuril προς το μέσο ύψος ή το μέσο εμβαδόν των κορυφών του εσωτερικού προτύπου προς τη συγκέντρωση δικλαζουρίλης στα διαλύματα βαθμονόμησης (μg/ml).

5.3.3. Χρωματογραφική ανάλυση των διαλυμάτων βαθμονόμησης

Εγχύονται κατ' επανάληψη 20 μl του διαλύματος δείγματος (σημείο 5.2.1 ή 5.2.2) και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του diclazuril και του εσωτερικού προτύπου.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

6.1. *Σύνθετες ζωοτροφές*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)}^{-b}}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ή } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)}^{-b}}{a} \times \frac{10V}{m}$$

όπου:

— ύψος (d, s) = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.1)

— Εμβαδόν (d, s) = εμβαδόν κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.1)

— Το ύψος (i,s) είναι το ύψος (εμβαδόν) κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.1)

— Το εμβαδόν (i,s) είναι το εμβαδόν κορυφής του εσωτερικού προτύπου στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.1)

— b είναι η τομή της καμπύλης βαθμονόμησης που χαράσσεται από τα διαλύματα βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) σύμφωνα με το σημείο 5.3.2

— a είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που χαράσσεται από τα διαλύματα βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) σύμφωνα με το σημείο 5.3.2

— m είναι η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια

— V είναι ο τελικός όγκος, σε ml, του εκχυλίσματος δείγματος μετά την εκ νέου διάλυση σύμφωνα με το σημείο 5.2.1 (δηλαδή 2,5 ml).

6.2. *Προμείγματα*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε diclazuril κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)}^{-b}}{a} \times \frac{0{,}02V}{m} \times \text{ p or } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)}^{-b}}{a} \times \frac{0{,}02V}{m} \times \text{ p}$$

όπου:

— h d, s = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.2)

— h d, s = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.2)

— h d, s = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.2)

— h d, s = ύψος (εμβαδόν) κορυφής του diclazuril στο διάλυμα δείγματος (σημείο 5.2.2)

— B είναι η τομή της καμπύλης βαθμονόμησης που χαράσσεται από τα διαλύματα βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) σύμφωνα με το σημείο 5.3.2

— A είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που χαράσσεται από τα διαλύματα βαθμονόμησης (σημεία 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 και 3.10.5) σύμφωνα με το σημείο 5.3.2

— m είναι η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε χιλιοστόγραμμα

— V = όγκος του εκχυλίσματος δείγματος σύμφωνα με το σημείο 5.2.2 (δηλαδή 25 ml)

— p = ονομαστική συγκέντρωση του diclazuril σε mg/kg στο πρόμειγμα.

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (σημείο 5.2.1 ή 5.2.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (σημείο 3.10.2).

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (σημείο 5.2.1 ή 5.2.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (σημείο 3.10.2). Η ποσότητα του προστιθέμενου diclazuril πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του diclazuril που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του diclazuril και της κορυφής του εσωτερικού προτύπου πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 10 % του αρχικού πλάτους της κορυφής του diclazuril ή της κορυφής του εσωτερικού προτύπου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος δείγματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Για την ανίχνευση σε συστοιχία διόδων λυχνιών, το όριο αυτό είναι συνήθως ± 2 nm.

β) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10 %-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 230 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10%-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— το 30 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril από 0,5 mg/kg έως 2,5 mg/kg,

— τα 0,75 mg/kg για περιεκτικότητες σε diclazuril μεταξύ 2,5 mg/kg και 5 mg/kg,

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε diclazuril άνω των 5 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Διοργανώθηκαν δύο διεργαστηριακές μελέτες. Στην πρώτη, που πραγματοποιήθηκε από άλλη ομάδα το 1994, τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν δύο προμείγματα (Ο 100, Α 100) και τρία δείγματα συμπληρωματικών ζωοτροφών για πουλερικά (L1, Z1, K1). Τα δείγματα αυτά συνίσταντο σε δύο προμείγματα: το ένα αναμείχθηκε με οργανικό υλικό (Ο 100) και το άλλο με ανόργανο υλικό (Α 100). Η θεωρητική περιεκτικότητα είναι 100 mg diclazuril ανά kg. Οι οδηγίες προς τα εργαστήρια ήταν να αναλύσουν κάθε δείγμα μια φορά ή εις διπλούν. (Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με αυτή τη διεργαστηριακή μελέτη βλέπε *Journal of AOAC International*, τόμος 77, αριθ. 6, 1994, σ. 1359-1361).

Στη δεύτερη συνεργατική μελέτη αναλύθηκαν τρεις σύνθετες ζωοτροφές για πουλερικά, οι οποίες περιέχουν diclazuril σε συγκεντρώσεις 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) και τυφλές ζωοτροφές (MAT 3). (Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με αυτή τη διεργαστηριακή μελέτη βλέπε JRC Technical report (2016) και *Journal of AOAC International*, τόμος 102, αριθ. 2, 2019, σ. 646-652). Τα αποτελέσματα των δύο συνεργατικών μελετών παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

	Δείγμα 1A 100	Δείγμα 2O 100	Δείγμα 3 L1	Δείγμα 4 Z1	Δείγμα 5 K1	Δείγμα 6 MAT 1	Δείγμα 7 MAT 2	Δείγμα 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Μέσος όρος (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S_r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV_r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S_r (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV_R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Ονομαστική περιεκτικό-τητα (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Στοιχεία αναφοράς (*)	Πρώτη μελέτη του 1 994	Πρώτη μελέτη του 1 994	Πρώτη μελέτη του 1 994	Πρώτη μελέτη του 1 994	Πρώτη μελέτη του 1 994	Δεύτερη μελέτη του 2 015	Δεύτερη μελέτη του 2 015	Δεύτερη μελέτη του 2 015

L = αριθμός εργαστηρίων

n = αριθμός μεμονωμένων τιμών

S_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r = συντελεστής μεταβλητότητας επαναληψιμότητας

S_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = συντελεστής μεταβλητότητας αναπαραγωγιμότητας

LOQ = όριο ποσοτικοποίησης

(*) Πρώτη μελέτη του 1994: *Journal of AOAC International*, τόμος 77, αριθ. 6, 1994, σ. 1359-1361· Δεύτερη μελέτη του 2015· JRC Technical report «Revalidation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study» (2016).

9. **Γενικές παρατηρήσεις**

Η απόκριση του diclazuril πρέπει να έχει καταδειχθεί προηγουμένως ότι είναι γραμμική στην περιοχή των μετρούμενων συγκεντρώσεων.

Τουλάχιστον για την ανάλυση του diclazuril σε σύνθετες ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (για τον σκοπό αυτό που υπερβαίνει το 12 % σε λίπος), η αναλυτική μέθοδος μπορεί να αντικατασταθεί από άλλες μεθόδους που βασίζονται στην HPLC, π.χ. με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με μέθοδο φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS), υπό την προϋπόθεση ότι η εναλλακτική μέθοδος έχει ισοδύναμα χαρακτηριστικά απόδοσης (ποσοστό ανάκτησης, ακρίβεια σε συνθήκες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας).

Z. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΑΤΟΣ ΤΟΥ LASALOCID ΜΕ ΝΑΤΡΙΟ

Άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον Streptomyces lasaliensis

Η περιεκτικότητα σε lasalocid προσδιορίζεται με

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης με τη χρήση φασματοφθορομετρικού ανιχνευτή (φθορισμού), όπως περιγράφεται στα σημεία 1 έως 8 κατωτέρω.

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του άλατος του lasalocid με νάτριο σε ζωοτροφές. Το όριο ανίχνευσης είναι 5 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 10 mg/kg.

2. **Αρχή**

Το άλας του lasalocid με νάτριο εκχυλίζεται από το δείγμα σε οξυνισμένη μεθανόλη και προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανεστραμμένης φάσης με χρήση φασματοφθορισμομετρικού ανιχνευτή (φθορισμού).

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4).

3.2. Ορθοφωσφορικό οξύ, w (w/w) = 85 %.

3.3. Διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος, c = 20 %

Διαλύονται 23,5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (σημείο 3.2) σε 100 ml με νερό.

3.4. 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνη (1,5-διμεθυλεξυλαμίνη), w (w/w) = 99 %.

3.5. Μεθανόλη καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

3.6. Υδροχλωρικό οξύ, πυκνότητα = 1,19 g/ml.

3.7. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, c = 0,01 mol/l

Διαλύονται 1,36 g KH_2PO_4 (σημείο 3.1) σε 500 ml νερού (σημείο 3.11), προστίθενται 3,5 ml ορθοφωσφορικού οξέος (σημείο 3.2) και 10,0 ml 6-μεθυλο-2-επτυλαμίνης (σημείο 3.4) Ρυθμίζεται το pH σε 4,0 με διάλυμα ορθοφωσφορικού οξέος (σημείο 3.3) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 1 000 ml με νερό (σημείο 3.11).

3.8. Οξυνισμένη μεθανόλη

5,0 ml υδροχλωρικού οξέος (σημείο 3.6) μεταγγίζονται σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη (σημείο 3.5) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

3.9. Κινητή φάση για την HPLC, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων-διάλυμα μεθανόλης σε αναλογία 5 + 95 (V + V)

Αναμειγνύονται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (σημείο 3.7) με 95 ml μεθανόλης (σημείο 3.5).

3.10. Πρότυπη ουσία άλατος lasalocid με νάτριο εγγυημένης καθαρότητας, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (άλας με νάτριο πολυαιθέρα μονοκαρβονικού οξέος παραγόμενου από τον *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg άλατος lasalocid με νάτριο (σημείο 3.10), διαλύονται σε οξυνισμένη μεθανόλη (σημείο 3.8), ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

3.10.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα άλατος lasalocid με νάτριο, 50 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml φέρονται με σιφώνιο 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.10.1) και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (σημείο 3.8) και το σύνολο ανακινείται. Το διάλυμα παρασκευάζεται για άμεση χρήση.

3.10.3. Διαλύματα αναφοράς

1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 ml του ενδιαμέσου πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.10.2) μεταγγίζονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (σημείο 3.8) και οι φιάλες ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 και 10,0 μg/ml άλατος lasalocid με νάτριο αντιστοίχως. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται για άμεση χρήση.

3.11. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC.

4. **Όργανα**

4.1. Λουτρό υπερήχων (ή ανακινούμενο υδατόλουτρο) με ελεγχόμενη θερμοκρασία.

4.2. Φίλτρα μεμβράνης 0,45 μm.

4.3. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης, κατάλληλο για έγχυση όγκων 20 μl.

4.3.1. Υγρή χρωματογραφική στήλη, 125 mm × 4 mm, αντίστροφης φάσης C_{18}, 5 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη.

4.3.2. Φασματοφθορισμόμετρο με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (σημείο 5.1.2), πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε άλας του lasalocid με νάτριο ούτε κάποια άλλη παρεμποδιστική ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνο του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό άλας του lasalocid με νάτριο ή άλλες παρεμποδιστικές ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας άλατος του lasalocid με νάτριο, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.10.1) μεταγγίζονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επιμελώς και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (σημείο 5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε σημείο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα άλατος του lasalocid με νάτριο παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. *Εκχύλιση*

5.2.1. Ζωοτροφές

Σε κωνική φιάλη των 250 ml με πώμα ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,01 g, 5 έως 10 g του δείγματος. Προστίθενται με σιφώνιο 100,0 ml οξυνισμένης μεθανόλης (σημείο 3.8). Τοποθετείται χαλαρά το πώμα και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (σημείο 4.1) και αφήνεται για 20 λεπτά στους 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, στη συνέχεια καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (σημείο 4.2) σε κατάλληλο δοχείο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.2.2. Προμείγματα

Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,001 g, 2 g του μη αλεσμένου προμείγματος. Προστίθενται 100,0 ml οξυνισμένης μεθανόλης (σημείο 3.8) και ακολουθεί περιδίνηση μέχρι να επιτευχθεί διασπορά. Η φιάλη με το περιεχόμενό της τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (σημείο 4.1) και αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περίπου 40 °C, στη συνέχεια απομακρύνεται από το λουτρό και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με οξυνισμένη μεθανόλη (σημείο 3.8) και αναμειγνύεται επιμελώς. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία επί μία ώρα μέχρι να καθιζάνουν οι αιωρούμενες ύλες, στη συνέχεια καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης 0,45 μm (σημείο 4.2). Κατάλληλος όγκος του διαυγούς διηθήματος αραιώνεται με οξυνισμένη μεθανόλη (σημείο 3.8) για να ληφθεί το τελικό διάλυμα της δοκιμής που περιέχει περίπου 4 μg/ml άλατος lasalocid με νάτριο. Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.3. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω, δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες· μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα:

Υγρή χρωματογραφική στήλη στήλη (σημείο 4.3.1):	125 mm × 4 mm, αντίστροφη φάση C_{18}, 5 μm πλήρωση, ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (σημείο 3.9):	Μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (σημείο 3.7) και μεθανόλης (σημείο 3.5), 5 + 95 (V + V)
Ρυθμός ροής:	1,2 ml/min
Μήκη κύματος ανίχνευσης:	Διέγερσης: 310 nm
	Εκπομπής: 419 nm
Όγκος έγχυσης:	20 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχέοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα αναφοράς (σημείο 3.10.3) που περιέχει 4,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Γράφημα βαθμονόμησης

Κάθε διάλυμα αναφοράς (σημείο 3.10.3) εγχέεται κατ' επανάληψη και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων αναφοράς και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχέεται κατ' επανάληψη το εκχύλισμα του δείγματος που προέκυψε στο σημείο 5.2.1 ή 5.2.2 χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του άλατος lasalocid με νάτριο.

6. **Υπολογισμός αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml προσδιορίζεται από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών τον άλατος lasalocid με νάτριο του διαλύματος του δείγματος βάσει της καμπύλης αναφοράς ή βαθμονόμησης (σημείο 5.3.3).

6.1. *Ζωοτροφές*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (σημείο 5.2.1) σε μg/ml

V_1 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με το σημείο 5.2.1 σε ml (δηλαδή 100)

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

6.2. *Προμείγματα*

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άλας lasalocid με νάτριο κατά βάρος (mg/kg) δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = συγκέντρωση του άλατος lasalocid με νάτριο στο δείγμα (σημείο 5.2.2) σε μg/ml

V_2 = όγκος εκχυλίσματος του δείγματος σύμφωνα με το σημείο 5.2.2 σε ml (δηλαδή 250)

f = συντελεστής αραίωσης σύμφωνα με το σημείο 5.2.2

M = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Οι φασματοφθορισμομετρικές μέθοδοι είναι λιγότερο εκτεθειμένες σε παρεμβολές σε σύγκριση με αυτές που χρησιμοποιούν ανιχνευτή υπεριώδους. Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (σημείο 5.2.1 ή 5.2.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος αναφοράς (σημείο 3.10.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου άλατος lasalocid με νάτριο πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του άλατος lasalocid με νάτριο που βρίσκεται στο εκχύλισμα. Αυξάνεται μόνο το ύψος της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο αφού ληφθεί υπόψη η ποσότητα άλατος lasalocid με νάτριο που προστέθηκε και ηαραίωση του εκχυλίσματος. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 10 % του αρχικού πλάτους της κορυφής του άλατος lasalocid με νάτριο του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει:

— Το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο από 30 mg/kg έως 100 mg/kg,

— τα 15 mg/kg για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο μεταξύ 100 mg/kg και 200 mg/kg,

— το 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε άλας lasalocid με νάτριο άνω των 200 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Για το εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %. Για τα εμπλουτισμένα δείγματα προμειγμάτων, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη (*) στην οποία αναλύθηκαν 2 προμείγματα (δείγματα 1 και 2) και 5 ζωοτροφές (δείγματα 3 έως 7) από δώδεκα εργαστήρια Η ανάλυση του κάθε δείγματος έγινε εις διπλούν. Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 Πρόμειγμα για κοτόπουλα	Δείγμα 2 Πρόμειγμα για γαλοπούλες	Δείγμα 3 Σύμπηκτα για γαλοπούλες	Δείγμα 4 Θρύμματα για κοτόπουλα	Δείγμα 5 Ζωοτροφή για γαλοπούλες	Δείγμα 6 Ζωοτροφή για πουλερικά Α	Δείγμα 7 Ζωοτροφή για πουλερικά Β
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Μέσος όρος [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Ονομαστική περιεκτικό-τητα [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = αριθμός εργαστηρίων

N = αριθμός μεμονωμένων τιμών

s_r = τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

s_R = τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_r = συντελεστής μεταβλητότητας της επαναληψιμότητας, %

CV_R = συντελεστής μεταβλητότητας της αναπαραγωγιμότητας, %

(*) Analyst, 1995, 120, σ. 2175-2180.

(**) Περιεκτικότητα δηλωμένη από τον κατασκευαστή.

(+) Ζωοτροφή που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Η. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΑΜΠΡΟΛΙΟΥ

χλωριούχο (1-[(4-αμινο-2-προπυλο-5-πυριμιδινυλο)μεθυλο]-2-μεθυλοπυριδίνιο μονοϋδροχλωρικό

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό του αμπρολίου σε ζωοτροφές. Το όριο ανίχνευσης είναι 1 mg/kg, το όριο προσδιορισμού είναι 5 mg/kg.

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα μεθανόλης-νερού. Έπειτα από αραίωση με την κινητή φάση και διήθηση μέσω φίλτρου μεμβράνης, η περιεκτικότητα σε αμπρόλιο προσδιορίζεται με κατιοανταλλακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με χρήση ανιχνευτή υπεριώδους.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Μεθανόλη

3.2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.3. Νερό καθαρότητας ισοδύναμης με HPLC

3.4. Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου, c = 0,1 mol/l

13,80 g μονοένυδρου δισόξινου φωσφορικού νατρίου διαλύονται σε νερό (σημείο 3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό (σημείο 3.3) μέχρι τη χαραγή και ανακινείται.

3.5. Διάλυμα υπερχλωρικού νατρίου, c = 1,6 mol/l

224,74 g μονοένυδρου υπερχλωρικού νατρίου διαλύονται σε νερό (σημείο 3.3) σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό (σημείο 3.3) και ανακινείται.

3.6. Κινητή φάση για την HPLC (βλέπε παρατήρηση στο σημείο 9.1)

Μείγμα ακετονιτριλίου (σημείο 3.2), διαλύματος δισόξινου φωσφορικού νατρίου (σημείο 3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (σημείο 3.5) 450 + 450 + 100 (v+v+v). Πριν από τη χρήση, διηθείται διαμέσου διηθητικής μεμβράνης πάχους 0,22 μm (σημείο 4.3) και το διάλυμα απαεριώνεται [π.χ. σε λουτρό υπερήχων (σημείο 4.4) για 15 λεπτά τουλάχιστον].

3.7. Πρότυπη ουσία: καθαρό αμπρόλιο, χλωριούχο 1-[(4-αμινο-2-προπυλοπυριμιδιν-5-υλο)μεθυλο]-2-μεθυλοπυριδίνιο, E 750 (βλέπε σημείο 9.2)

3.7.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 500 μg/ml

Σε ογκομετρική σφαιρική φιάλη των 100 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg, 50 mg αμπρολίου (σημείο 3.7), διαλύονται σε 80 ml μεθανόλης (σημείο 3.1) και η φιάλη τοποθετείται για 10 min σε λουτρό υπερήχων (σημείο 4.4). Στη συνέχεια, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και ανακινείται. Σε θερμοκρασία ≤ 4 C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.7.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα αμπρολίου, 50 μg/ml

5,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.7.1) παραλαμβάνονται με σιφώνιο και φέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.8) και ανακινείται. Σε θερμοκρασία ≤ 4 C το διάλυμα είναι σταθερό για έναν μήνα.

3.7.3. Διαλύματα βαθμονόμησης

0,5, 1,0 και 2,0 ml του ενδιαμέσου πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.7.2) μεταφέρονται σε μια σειρά ογκομετρικών φιαλών των 50 ml. Συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (σημείο 3.6) και ανακινούνται. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,5, 1,0 και 2,0 μg αμπρολίου ανά ml αντιστοίχως. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να ετοιμάζονται λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν.

3.8. Διαλύτης εκχύλισης

Μείγμα μεθανόλης (σημείο 3.1)-νερού 2 + 1 (v+v)

4. **Όργανα**

4.1. Εξοπλισμός HPLC με σύστημα έγχυσης, κατάλληλο για έγχυση όγκων 100 μl

4.1.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας 125 mm × 4 mm, κατιοανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 5 ή 10 μm, ή ισοδύναμη.

4.1.2. Ανιχνευτής UV με δυνατότητα ρύθμισης σε διάφορα μήκη κύματος ή με διάταξη διόδων.

4.2. Φίλτρο μεμβράνης, υλικό PTFE, 0,45 μm.

4.3. Φίλτρο μεμβράνης, 0,22 μm.

4.4. Λουτρό υπερήχων.

4.5. Συσκευή μηχανικής ανακίνησης ή μαγνητικός αναδευτήρας.

5. **Διαδικασία**

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Τυφλό

Για την εκτέλεση της δοκιμής ανάκτησης (σημείο 5.1.2), πρέπει να διενεργείται ανάλυση τυφλού ώστε να ελέγχεται ότι δεν υπάρχει ούτε αμπρόλιο ούτε κάποια άλλη παρεμποδίζουσα ουσία. Το τυφλό δείγμα πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και δεν πρέπει να ανιχνεύονται σε αυτό αμπρόλιο ή άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Δοκιμή ανάκτησης

Πρέπει να πραγματοποιείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση τυφλό δείγμα εμπλουτισμένο με προσθήκη ποσότητας αμπρολίου, παρόμοιας με εκείνη που υπάρχει στο δείγμα. Για εμπλουτισμό μέχρι 100 mg/kg, 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (σημείο 3.7.1) μεταφέρονται σε κωνική φιάλη των 250 ml και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, αναμειγνύονται επισταμένως και αφήνονται για 10 λεπτά αναμειγνύοντας πάλι μερικές φορές πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (σημείο 5.2).

Εναλλακτικά, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμο τυφλό παρόμοιου τύπου με το δείγμα (βλέπε σημείο 5.1.1), δοκιμή ανάκτησης μπορεί να γίνει μέσω της μεθόδου προσθήκης προτύπου. Στην περίπτωση αυτή, το προς ανάλυση δείγμα εμπλουτίζεται με ποσότητα αμπρολίου παρόμοια με εκείνη που υπάρχει ήδη στο δείγμα. Το δείγμα αυτό αναλύεται παράλληλα με το μη εμπλουτισμένο δείγμα και η ανάκτηση μπορεί να υπολογιστεί με αφαίρεση.

5.2. *Εκχύλιση*

5.2.1. Προμείγματα (περιεκτικότητα < 1 % σε αμπρόλιο) και ζωοτροφές

Σε κωνική φιάλη των 500 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,01 g, 5-40 g του δείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.8). Η φιάλη τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων (σημείο 4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (σημείο 4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (σημείο 3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 μg/ml και αναμειγνύεται (σημείο 9.3). 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται μέσω μεμβράνης (σημείο 4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.2.2. Προμείγματα (περιεκτικότητα ≥ 1 % σε αμπρόλιο)

Σε κωνική φιάλη των 500 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,001 g, 1-4 g του προμείγματος ανάλογα με την περιεκτικότητα σε αμπρόλιο και προστίθενται 200 ml διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.8). Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (σημείο 4.4) και αφήνεται για 15 λεπτά. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό και ανακινείται για 1 ώρα στο μηχανικό τάρακτρο ή αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα (σημείο 4.5). Κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος αραιώνεται με την κινητή φάση (σημείο 3.6) μέχρι περιεκτικότητας σε αμπρόλιο 0,5-2 μg/ml και αναμειγνύεται. 5-10 ml του αραιωμένου αυτού διαλύματος διηθούνται μέσω μεμβράνης (σημείο 4.2). Ακολουθεί προσδιορισμός με HPLC (σημείο 5.3).

5.3. *Προσδιορισμός με HPLC*

5.3.1. Παράμετροι

Παρακάτω δίδονται ενδεικτικά ορισμένες κατάλληλες συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικές συνθήκες εφόσον παρέχουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Υγρή χρωματογραφική στήλη (σημείο 4.1.1):	125 mm × 4 mm, κατιοανταλλακτικό υλικό πλήρωσης Nucleosil 10 SA, 5 ή 10 μm ή ισοδύναμη
Κινητή φάση (σημείο 3.6):	Μείγμα ακετονιτριλίου (σημείο 3.2), διαλύματος δισόξινου φωσφορικού νατρίου (σημείο 3.4) και διαλύματος υπερχλωρικού νατρίου (σημείο 3.5) 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Ρυθμός ροής:	0,7-1 ml/min
Μήκος κύματος ανίχνευσης:	264 nm
Όγκος έγχυσης:	100 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας κατ' επανάληψη το διάλυμα βαθμονόμησης (σημείο 3.7.3) που περιέχει 1,0 μg/ml, μέχρι να σταθεροποιηθούν τα ύψη των κορυφών και οι χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα βαθμονόμησης ή αναφοράς (σημείο 3.7.3) εγχύεται κατ' επανάληψη και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) της κορυφής κάθε συγκέντρωσης. Χαράσσεται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας ως τεταγμένες τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων βαθμονόμησης και ως τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.3.3. Διάλυμα δείγματος

Εγχύεται κατ' επανάληψη το εκχύλισμα του δείγματος (σημείο 5.2) χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο των διαλυμάτων βαθμονόμησης και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Από το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του αμπρολίου του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η περιεκτικότητα στο διάλυμα του δείγματος σε μg/ml βάσει της καμπύλης αναφοράς (σημείο 5.3.2).

Η συγκέντρωση κατά βάρος σε mg/kg του αμπρολίου στο δείγμα δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [mg/kg]$$

όπου:

V = όγκος του διαλύτη εκχύλισης (σημείο 3.8) σε ml σύμφωνα με το σημείο 5.2 (δηλαδή 200 ml)

c = συγκέντρωση αμπρολίου στο εκχύλισμα δείγματος (σημείο 5.2) σε μg/ml

f = συντελεστής αραίωσης σύμφωνα με το σημείο 5.2

m = βάρος του δείγματος δοκιμής σε g

7. **Επικύρωση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να ελεγχθεί με συγχρωματογραφία ή με τη βοήθεια ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του εκχυλίσματος (σημείο 5.2) και του διαλύματος βαθμονόμησης (σημείο 3.7.3) που περιέχει 2,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα δείγματος (σημείο 5.2) εμπλουτίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος βαθμονόμησης (σημείο 3.7.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου αμπρολίου πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του αμπρολίου που βρίσκεται στο εκχύλισμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο την προστιθέμενη ποσότητα όσο και την αραίωση του εκχυλίσματος, μόνον το ύψος της κορυφής του αμπρολίου πρέπει να βρίσκεται αυξημένο. Το πλάτος της κορυφής, στα μισά του ύψους, δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 10 % του αρχικού πλάτους της κορυφής του αμπρολίου του μη εμπλουτισμένου εκχυλίσματος.

7.1.2. Ανίχνευση με διάταξη διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης των φασμάτων του δείγματος και του προτύπου, που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι στο πλαίσιο των περιθωρίων που δικαιολογούνται από την αναλυτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Το περιθώριο αυτό στην ανίχνευση με διάταξη διόδων είναι συνήθως ± 2 nm.

β) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου που καταγράφονται στο υψηλότερο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και σε κανένα υπό παρατήρηση σημείο η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 210 και 320 nm, τα φάσματα του ανερχόμενου τμήματος, του υψηλότερου σημείου και του κατερχόμενου τμήματος της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα μέρη εκείνα του φάσματος που είναι στην περιοχή του 10-100 % της σχετικής πυκνότητας. Το κριτήριο αυτό εκπληρώνεται όταν εμφανίζονται τα ίδια μέγιστα και όταν σε όλα τα υπό παρατήρηση σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του υψηλότερου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα από αυτά τα κριτήρια δεν εκπληρώνεται, δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που πραγματοποιούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει

— το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο από 25 mg/kg έως 500 mg/kg,

— τα 75 mg/kg για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο μεταξύ 500 mg/kg και 1 000 mg/kg,

— το 7,5 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητες σε αμπρόλιο άνω των 1 000 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Σε εμπλουτισμένο (τυφλό) δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. **Αποτελέσματα διεργαστηριακής μελέτης**

Πραγματοποιήθηκε διεργαστηριακή μελέτη στην οποία αναλύθηκαν τρεις πτηνοτροφές (δείγμα 1-3), μία ανόργανη (δείγμα 4) και ένα πρόμειγμα (δείγμα 5). Τα αποτελέσματα δίδονται στον ακόλουθο πίνακα:

	Δείγμα 1 (τυφλό)	δείγμα 2	δείγμα 3	δείγμα 4	δείγμα 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Μέσος όρος [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Ονομαστική περιεκτικότητα [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L: αριθμός εργαστηρίων

n: αριθμός μεμονωμένων τιμών

s_r: τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας

CV_r: συντελεστής μεταβλητότητας επαναληψιμότητας

S_R: τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R: συντελεστής μεταβλητότητας αναπαραγωγιμότητας

9. **Παρατηρήσεις**

9.1. Εάν το δείγμα περιέχει θειαμίνη, η κορυφή της θειαμίνης στο χρωματογράφημα εμφανίζεται λίγο πριν από την κορυφή του αμπρολίου. Σύμφωνα με την παρούσα μέθοδο, το αμπρόλιο και η θειαμίνη πρέπει να διαχωρίζονται. Εάν το αμπρόλιο και η θειαμίνη δεν διαχωρίζονται από τη στήλη (σημείο 4.1.1) που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο, ένα μέρος του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης (σημείο 3.6) μέχρι 50 % πρέπει να αντικαθίσταται από μεθανόλη.

9.2. Σύμφωνα με τη Βρετανική Φαρμακοποιία, το φάσμα διαλύματος αμπρολίου (c = 0,02 mol/l) σε υδροχλωρικό οξύ (c = 0,1 mol/l) εμφανίζει μέγιστα στα 246 nm και 262 nm. Η απορρόφηση ανέρχεται σε 0,84 στα 246 nm και 0,80 στα 262 nm.

9.3. Το εκχύλισμα πρέπει να αραιώνεται πάντοτε με την κινητή φάση διότι διαφορετικά ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής του αμπρολίου μπορεί να μετατοπιστεί σημαντικά λόγω μεταβολών της ιονικής ισχύος.

Θ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΑΡΑΣΙΝΗΣ

Η περιεκτικότητα σε ναρασίνη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN ISO 14183 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός περιεκτικοτήτων σε μονενσίνη, ναρασίνη και σαλινομυκίνη — Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη.

Ι. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΙΚΑΡΒΑΖΙΝΗΣ

Η περιεκτικότητα σε νικαρβαζίνη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN 15782 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της νικαρβαζίνης — Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

ΙΑ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΚΟΚΙΝΑΤΗΣ

Η περιεκτικότητα σε δεκοκινάτη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN 16162 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός δεκοκινάτης με HPLC και ανίχνευση φθορισμού.

ΙΒ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΟΝΕΝΣΙΝΗΣ

Η περιεκτικότητα σε μονενσίνη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN ISO 14183 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός περιεκτικοτήτων σε μονενσίνη, ναρασίνη και σαλινομυκίνη — Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη

ΙΓ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΑΛΙΝΟΜΥΚΙΝΗΣ

Η περιεκτικότητα σε σαλινομυκίνη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN ISO 14183 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός περιεκτικοτήτων σε μονενσίνη, ναρασίνη και σαλινομυκίνη — Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας με παραγωγοποίηση μετά τη στήλη.

ΙΔ. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΕΜΔΟΥΡΑΜΥΚΙΝΗΣ

Η περιεκτικότητα σε σεμδουραμυκίνη προσδιορίζεται με:

— τη μέθοδο ανάλυσης που προβλέπεται στο πρότυπο EN 17299 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Ανίχνευση και προσδιορισμός των εγκεκριμένων κοκκιδιοστατικών ως προσθέτων με διασταυρούμενη επιμόλυνση του 1 % και 3 % και των μη καταχωρισμένων κοκκιδιοστατικών και ενός αντιβιοτικού σε επίπεδα υποπρόσθετης ύλης, σε σύνθετες ζωοτροφές με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης — ανίχνευση με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ή —

— τη μέθοδο που παρέχεται από το πρότυπο EN ISO 16158 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε σεμδουραμικινικά άλατα — Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας με αναλυτική προσέγγιση τύπου δένδρου.

ΙΕ. ΠΡΟΤΥΠΑ EN

Για την εφαρμογή του άρθρου 34 παράγραφος 2 στοιχείο α) του κανονισμού (ΕΕ) 2017/625 είναι συναφή τα ακόλουθα πρότυπα EN:

EN ISO 30024 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της δράσης της φυτάσης

EN 17050 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε ιώδιο με ICP-MS

EN 17550 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός καροτενοειδών σε σύνθετες ζωοτροφές και προμείγματα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανίχνευση UV (HPLC-UV)

EN 15784 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Bacillus* spp.

EN 15785 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Pediococcus* spp.

EN 15787 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Lactobacillus* spp.

EN 15788 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Lactobacillus* spp. που χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών

EN 15789 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Απομόνωση και καταμέτρηση του *Saccharomyces cerevisiae* που χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών

EN 15510 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου, κοβαλτίου, μολυβδαινίου, αρσενικού και μολύβδου με ICP-AES (για την ανάλυση των πρόσθετων υλών ζωοτροφών κοβάλτιο και μολυβδαίνιο)

EN 15621 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός του ασβεστίου, νατρίου, φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου, θείου, σιδήρου, ψευδαργύρου, χαλκού, μαγγανίου και κοβαλτίου μετά από χώνευση υπό πίεση με ICP-AES (για την ανάλυση της πρόσθετης ύλης ζωοτροφών κοβάλτιο)

EN 16159 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός σελήνιου με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σχηματισμού υδριδίων (SAAGH) μετά από χώνευση μικροκυμάτων (εκχύλιση με νιτρικό οξύ 65 % και υπεροξείδιο υδρογόνου 30 %) (για την ανάλυση της πρόσθετης ύλης ζωοτροφών σελήνιο)

EN 17053 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός ιχνοστοιχείων, βαρέων μετάλλων και άλλων στοιχείων με ICP-MS (μέθοδος πολλαπλών στοιχείων) (για την ανάλυση των πρόσθετων υλών ζωοτροφών κοβάλτιο, μολυβδαίνιο και σελήνιο)»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

Α. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΟΞΙΝΩΝ (PCDD/PCDF) ΚΑΙ ΤΩΝ PCB

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

1. Πεδίο εφαρμογής και ορισμοί

Τα δείγματα που προορίζονται για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των πολυχλωριωμένωνδιβενζο-π-διοξινών (PCDD), των πολυχλωριωμένωνδιβενζοφουρανίων (PCDF), των παρόμοιων με διοξίνες πολυχλωριωμένωνδιφαινυλίων (PCB) ([1]) και των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB στις ζωοτροφές λαμβάνονται σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος I. Ισχύουν οι ποσοτικές απαιτήσεις σε σχέση με τον έλεγχο των ουσιών ή προϊόντων που κατανέμονται ομοιόμορφα μέσα στις ζωοτροφές, όπως προβλέπεται στο σημείο 5.1 του παραρτήματος I. Τα συνολικά δείγματα που αποκτήθηκαν με τον τρόπο αυτό θεωρούνται αντιπροσωπευτικά των παρτίδων ή υποπαρτίδων από τις οποίες λαμβάνονται. Η συμμόρφωση με τα ανώτατα επίπεδα που προβλέπονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ διαπιστώνεται με βάση τα επίπεδα που προσδιορίζονται στα εργαστηριακά δείγματα.

Για τους σκοπούς του παρόντος μέρους εφαρμόζονται οι ορισμοί του παραρτήματος I του εκτελεστικού κανονισμού (ΕΕ) 2021/808 της Επιτροπής ([2]).

Επιπλέον των εν λόγω ορισμών, για τους σκοπούς του παρόντος μέρους Β εφαρμόζονται και οι ακόλουθοι ορισμοί:

([1]) Πίνακας TEF (= συντελεστές τοξικής ισοδυναμίας) για PCDD, PCDF και παρόμοια με διοξίνες PCB: οι WHO-TEF για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας για τον άνθρωπο βασίζονται στα συμπεράσματα της συνεδρίασης εμπειρογνωμόνων του διεθνούς προγράμματος για την ασφάλεια των χημικών ουσιών (IPCS) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), που διεξήχθη στη Γενεύη τον Ιούνιο του 2005 [Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223-241 (2006)].

Ομοειδής ουσία	Τιμή TEF	Ομοειδής ουσία	Τιμή TEF
Διβενζο-π-διοξίνες (“PCDD”) και διβενζοφουράνια (“PCDF”)		“Παρόμοια με διοξίνες” PCB Μη-ορθο PCB + Μονο-ορθο PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Μη-ορθο PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Μονο-ορθο-PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν: “T” = τετρα· “Pe” = πεντα· “Hx” = εξα· “Hp” = επτα· “O” = οκτα· “CDD” = χλωροδιβενζοδιοξίνη· “CDF” = χλωροδιβενζοφουράνιο· “CB” = χλωροδιφαινύλιο.

([2]) Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2021/808 της Επιτροπής, της 22ας Μαρτίου 2021, σχετικά με τις επιδόσεις των αναλυτικών μεθόδων για τα κατάλοιπα φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε τροφοπαραγωγά ζώα και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς και σχετικά με τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη δειγματοληψία, και για την κατάργηση των αποφάσεων 2002/657/ΕΚ και 98/179/ΕΚ (ΕΕ L 180 της 21.5.2021, σ. 84).

"Μέθοδοι διαλογής": μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επιλογή δειγμάτων με επίπεδα PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπερβαίνουν τα ανώτατα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης. Επιτρέπουν επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με καλή σχέση κόστους — αποτελεσματικότητας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες εντοπισμού νέων περιστατικών με υψηλή έκθεση και κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Οι μέθοδοι διαλογής βασίζονται σε βιοαναλυτικές μεθόδους ή μεθόδους GC-MS. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της συμμόρφωσης με το ανώτατο επίπεδο επαληθεύονται με πλήρη νέα ανάλυση από το αρχικό δείγμα με τη χρήση μεθόδου επιβεβαίωσης.

"Μέθοδοι επιβεβαίωσης": μέθοδοι που παρέχουν πλήρεις ή συμπληρωματικές πληροφορίες οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα σαφούς ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στο ανώτατο επίπεδο ή, σε περίπτωση ανάγκης, στο επίπεδο του ορίου ανάληψης δράσης. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν αεριοχρωματογραφία/φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (GC-HRMS) ή αεριοχρωματογραφία/δίδυμη φασματομετρία μαζών (GC-MS/MS).

2. Συμμόρφωση της παρτίδας ή της υποπαρτίδας με το ανώτατο επίπεδο

2.1. *Όσον αφορά τα μη παρόμοια με διοξίνες PCB*

Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο αν το αναλυτικό αποτέλεσμα για το άθροισμα των PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 και PCB 180 (στο εξής: "μη παρόμοια με τις διοξίνες PCB") δεν υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο που προβλέπεται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας της μέτρησης ([3]). Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο που ορίζεται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ εάν ο μέσος όρος των δύο αναλυτικών αποτελεσμάτων για το ανώτερο όριο ([4]) που θα προκύψουν από την ανάλυση εις διπλούν ([5]), λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, δηλαδή η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά την αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης.

Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης υπολογίζεται με τη χρήση ενός συντελεστή κάλυψης ίσου με 2, ο οποίος παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Μια παρτίδα ή υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές αν ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών μείον τη διευρυμένη αβεβαιότητα του μέσου όρου υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο.

Οι κανόνες που αναφέρονται στα ανωτέρω εδάφια του παρόντος σημείου εφαρμόζονται για τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προκύπτουν από το δείγμα που λαμβάνεται για επίσημο έλεγχο. Στην περίπτωση αναλύσεων με σκοπό τη γνωμοδότηση δεύτερου εμπειρογνώμονα ή για σκοπούς διαιτησίας, εφαρμόζεται η εθνική νομοθεσία.

2.2. *Όσον αφορά τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB*

Η παρτίδα ή υποπαρτίδα συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο αν το αναλυτικό αποτέλεσμα μεμονωμένης ανάλυσης

— που εκτελείται με μέθοδο διαλογής με ποσοστό ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων χαμηλότερο από 5 % δείχνει ότι το επίπεδο δεν υπερβαίνει το αντίστοιχο ανώτατο επίπεδο των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ,

— που εκτελείται με μέθοδο επιβεβαίωσης δεν υπερβαίνει το αντίστοιχο ανώτατο επίπεδο των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

([3]) Οι αρχές που περιγράφονται στο "Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την αβεβαιότητα μέτρησης για εργαστήρια που διεξάγουν ανάλυση PCDD/F και PCB με φασματομετρία μάζας αραίωσης ισοτόπων" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) τηρούνται κατά περίπτωση.

([4]) Η έννοια του "ανώτερου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τη συμμετοχή κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά. Η έννοια του "κατώτερου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση της μηδενικής τιμής για τη συμμετοχή κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά. Η έννοια του "ενδιάμεσου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση του μισού του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τον υπολογισμό της συμμετοχής κάθε ομοειδούς ουσίας που δεν προσδιορίζεται ποσοτικά.

([5]) Κατά κανόνα ισχύουν οι απαιτήσεις για την ανάλυση εις διπλούν που προβλέπονται στο παράρτημα ΙΙ κεφάλαιο Γ σημείο 3. Ωστόσο, για τις μεθόδους με χρήση εσωτερικού προτύπου με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C για τις σχετικές προσδιοριζόμενες ουσίες, ανάλυση εις διπλούν είναι απαραίτητη μόνο αν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο. Ανάλυση εις διπλούν χρειάζεται για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή ακούσιας σύγχυσης δειγμάτων. Στην περίπτωση που η ανάλυση εκτελείται στη διάρκεια ενός περιστατικού μόλυνσης, η επιβεβαίωση με ανάλυση εις διπλούν μπορεί να παραλειφθεί αν τα δείγματα που επιλέγονται για ανάλυση μπορούν να συνδεθούν με το περιστατικό μόλυνσης μέσω ιχνηλασιμότητας και το επίπεδο που βρέθηκε υπερβαίνει σημαντικά το ανώτατο επίπεδο.

Για τις δοκιμασίες διαλογής καθορίζεται μια τιμή αποκοπής (cut-off value) για τη λήψη των αποφάσεων σχετικά με τη συμμόρφωση ή μη του δείγματος με τα αντίστοιχα ανώτατα επίπεδα τα οποία έχουν καθοριστεί είτε για τις PCDD/F είτε για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

Η παρτίδα ή η υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο που ορίζεται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ εάν ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο αναλυτικών αποτελεσμάτων για το ανώτερο όριο ([6]) που θα προκύψουν από την ανάλυση εις διπλούν ([7]) με χρήση μιας μεθόδου επιβεβαίωσης, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο πέραν κάθε λογικής αμφιβολίας, δηλαδή η συγκέντρωση που προκύπτει από την ανάλυση, μετά την αφαίρεση της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης.

Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης υπολογίζεται με τη χρήση ενός συντελεστή κάλυψης ίσου με 2, ο οποίος παρέχει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Μια παρτίδα ή υποπαρτίδα δεν συμμορφώνεται με τις προδιαγραφές αν ο μέσος όρος των μετρούμενων τιμών μείον τη διευρυμένη αβεβαιότητα του μέσου όρου υπερβαίνει το ανώτατο επίπεδο.

Το άθροισμα της εκτίμησης της διευρυμένης αβεβαιότητας των ξεχωριστών αναλυτικών αποτελεσμάτων των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB χρησιμοποιείται για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

Οι κανόνες που αναφέρονται στα ανωτέρω εδάφια του παρόντος σημείου εφαρμόζονται για τα αποτελέσματα των αναλύσεων που προκύπτουν από το δείγμα που λαμβάνεται για επίσημο έλεγχο. Στην περίπτωση αναλύσεων για λόγους προσφυγής ή αναφοράς, εφαρμόζεται η εθνική νομοθεσία.

3. **Αποτελέσματα που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης σύμφωνα με το παράρτημα ΙΙ της οδηγίας 2002/32/ΕΚ**

Τα όρια ανάληψης δράσης αποτελούν εργαλείο για την επιλογή δειγμάτων στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες είναι αναγκαίο να προσδιοριστεί μια πηγή μόλυνσης και να ληφθούν μέτρα για τη μείωση ή την εξάλειψή της. Οι μέθοδοι διαλογής καθορίζουν τις κατάλληλες τιμές αποκοπής για την επιλογή αυτών των δειγμάτων. Όταν απαιτούνται σημαντικές προσπάθειες για τον προσδιορισμό μιας πηγής και τη μείωση ή την εξάλειψη της μόλυνσης, ενδείκνυται να επιβεβαιωθεί η υπέρβαση του ορίου ανάληψης δράσης μέσω ανάλυσης εις διπλούν, με χρήση μιας μεθόδου επιβεβαίωσης και λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης ([8]).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΠΙΣΗΜΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΔΙΟΞΙΝΩΝ (PCDD/F) ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΟΜΟΙΩΝ ΜΕ ΔΙΟΞΙΝΕΣ PCB ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Οι απαιτήσεις που καθορίζονται στο παρόν κεφάλαιο εφαρμόζονται στις αναλύσεις ζωοτροφών για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των υποκατεστημένων στις θέσεις 2,3,7,8 PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και όσον αφορά την προετοιμασία δειγμάτων και τις αναλυτικές απαιτήσεις για άλλους κανονιστικούς σκοπούς, που περιλαμβάνει τους ελέγχους που εκτελούνται από τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για να εξασφαλιστεί η συμμόρφωση με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 183/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ([9]).

Ο έλεγχος για την παρουσία PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB στις ζωοτροφές μπορεί να διενεργηθεί με δύο διαφορετικούς τύπους αναλυτικών μεθόδων:

([6]) Η έννοια του "ανώτερου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τη συμμετοχή κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο τοξικό ισοδύναμο (TEQ). Η έννοια του "κατώτερου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση της μηδενικής τιμής για τη συμμετοχή κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο TEQ. Η έννοια του "ενδιάμεσου ορίου" απαιτεί τη χρησιμοποίηση του μισού του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού για τον υπολογισμό της συμμετοχής κάθε μη ποσοτικά προσδιοριζόμενης ομοειδούς ουσίας στο TEQ.

([7]) Κατά κανόνα ισχύουν οι απαιτήσεις για την ανάλυση εις διπλούν που προβλέπονται στο παράρτημα ΙΙ κεφάλαιο Γ σημείο 3. Ωστόσο, για τις μεθόδους επιβεβαίωσης με χρήση εσωτερικού προτύπου με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C για τις σχετικές προσδιοριζόμενες ουσίες, ανάλυση εις διπλούν είναι απαραίτητη μόνο αν το αποτέλεσμα του πρώτου προσδιορισμού δεν συμμορφώνεται με το ανώτατο επίπεδο. Ανάλυση εις διπλούν χρειάζεται για να αποκλειστεί η πιθανότητα εσωτερικής διασταυρούμενης μόλυνσης ή ακούσιας σύγχυσης δειγμάτων. Στην περίπτωση που η ανάλυση εκτελείται στη διάρκεια ενός περιστατικού μόλυνσης, η επιβεβαίωση με ανάλυση εις διπλούν μπορεί να παραλειφθεί αν τα δείγματα που επιλέγονται για ανάλυση μπορούν να συνδεθούν με το περιστατικό μόλυνσης μέσω ιχνηλασιμότητας και το επίπεδο που βρέθηκε υπερβαίνει σημαντικά το ανώτατο επίπεδο.

([8]) Οι εξηγήσεις και οι απαιτήσεις για την εις διπλούν ανάλυση για τον έλεγχο των ορίων ανάληψης δράσης είναι ίδιες με εκείνες της υποσημείωσης 5 για τα ανώτατα επίπεδα.

([9]) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 183/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 12ης Ιανουαρίου 2005 περί καθορισμού των απαιτήσεων για την υγιεινή των ζωοτροφών (ΕΕ L 35 της 8.2.2005, σ. 1).

α) *Μέθοδοι διαλογής*

Στόχος των μεθόδων διαλογής είναι η επιλογή δειγμάτων με επίπεδα PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπερβαίνουν τα μέγιστα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης. Οι μέθοδοι διαλογής εξασφαλίζουν επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με καλή σχέση κόστους — αποτελεσματικότητας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες εντοπισμού νέων περιστατικών με υψηλή έκθεση και κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Η εφαρμογή τους αποσκοπεί στην αποφυγή αποτελεσμάτων ψευδούς συμμόρφωσης. Μπορούν να περιλαμβάνουν βιοαναλυτικές μεθόδους και μεθόδους GC-MS.

Οι μέθοδοι διαλογής συγκρίνουν το αναλυτικό αποτέλεσμα με μια τιμή αποκοπής, παρέχοντας μια απόφαση τύπου ναι/όχι για την πιθανή υπέρβαση του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης. Η συγκέντρωση των PCDD/F και του αθροίσματος των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB σε δείγματα για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι δεν συμμορφώνονται με το ανώτατο επίπεδο προσδιορίζεται ή επιβεβαιώνεται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.

Επιπλέον, οι μέθοδοι διαλογής μπορούν να δώσουν μια ένδειξη των επιπέδων PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες PCB που περιέχονται στο δείγμα. Σε περίπτωση εφαρμογής βιοαναλυτικών μεθόδων διαλογής, το αποτέλεσμα εκφράζεται σε βιοαναλυτικά ισοδύναμα (BEQ), ενώ σε περίπτωση εφαρμογής φυσικοχημικών μεθόδων GC-MS εκφράζεται σε τοξικά ισοδύναμα (TEQ). Τα αριθμητικώς εκφραζόμενα αποτελέσματα των μεθόδων διαλογής είναι κατάλληλα για να καταδείξουν τη συμμόρφωση ή την υπόνοια μη συμμόρφωσης ή υπέρβασης των ορίων ανάληψης δράσης και να παράσχουν μια ένδειξη για το εύρος των επιπέδων σε περίπτωση επανελέγχου με μεθόδους επιβεβαίωσης. Δεν είναι κατάλληλα για σκοπούς όπως η εκτίμηση των επιπέδων υποβάθρου, η εκτίμηση της πρόσληψης, η παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης των επιπέδων ή η εκ νέου αξιολόγηση των ορίων ανάληψης δράσης και των ανώτατων επιπέδων.

β) *Μέθοδοι επιβεβαίωσης*

Οι μέθοδοι επιβεβαίωσης επιτρέπουν την αναμφισβήτητη ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB που υπάρχουν σε ένα δείγμα και παρέχουν πλήρη στοιχεία στο επίπεδο των επιμέρους ομοειδών ουσιών. Ως εκ τούτου, οι εν λόγω μέθοδοι επιτρέπουν τον έλεγχο των ανώτατων επιπέδων και των ορίων ανάληψης δράσης, καθώς και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από μεθόδους διαλογής. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των χαμηλών επιπέδων υπόβαθρου κατά τον έλεγχο των ζωοτροφών, την παρακολούθηση των χρονικών τάσεων, την αξιολόγηση της έκθεσης και τη δημιουργία βάσης δεδομένων για πιθανή επαναξιολόγηση των ορίων ανάληψης δράσης και των ανώτατων επιπέδων. Αυτές οι μέθοδοι είναι επίσης σημαντικές για τον καθορισμό του προφίλ ομοειδών ουσιών με σκοπό για τον εντοπισμό της πηγής μιας πιθανής μόλυνσης. Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν GC-HRMS. Για την επιβεβαίωση της συμμόρφωσης ή της μη συμμόρφωσης με το ανώτατο επίπεδο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και GC-MS/MS.

2. **Ιστορικό**

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων TEQ, οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ουσιών σε ένα δεδομένο δείγμα πολλαπλασιάζονται επί τον αντίστοιχο συντελεστή τοξικής ισοδυναμίας τους (TEF) (βλέπε υποσημείωση 1 του κεφαλαίου I) και στη συνέχεια αθροίζονται για να προκύψει η συνολική συγκέντρωση των παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων, εκφρασμένη σε τοξικά ισοδύναμα (TEQ).

Για τους σκοπούς του παρόντος μέρους A, το αποδεκτό ειδικό όριο ποσοτικού προσδιορισμού μιας επιμέρους ομοειδούς ουσίας είναι η χαμηλότερη περιεκτικότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα και η οποία πληροί τα κριτήρια ταυτοποίησης που περιγράφονται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους EPA 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού μιας επιμέρους ομοειδούς ουσίας είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ως:

α) η συγκέντρωση μιας προσδιοριζόμενης ουσίας στο εκχύλισμα δείγματος η οποία παράγει απόκριση των οργάνων σε δύο διαφορετικά ιόντα που πρόκειται να ελεγχθούν με λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) 3:1 για το λιγότερο εντατικό σήμα ανεπεξέργαστων δεδομένων·

β) αν, για τεχνικούς λόγους, ο υπολογισμός του λόγου σήματος προς θόρυβο δεν παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα, το κατώτατο σημείο συγκέντρωσης σε μια καμπύλη βαθμονόμησης που παρέχει μια αποδεκτή (≤ 30 %) και συνεπή (μετρημένη τουλάχιστον στην αρχή και στο τέλος μιας αναλυτικής σειράς δειγμάτων) απόκλιση από τον μέσο σχετικό συντελεστή απόκρισης, υπολογισμένη για όλα τα σημεία στην καμπύλη βαθμονόμησης σε κάθε σειρά δειγμάτων. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) υπολογίζεται από το κατώτατο σημείο συγκέντρωσης, λαμβάνοντας υπόψη την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων και τη φόρτωση δείγματος.

Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι διαλογής δεν δίνουν αποτελέσματα στο επίπεδο των ομοειδών ουσιών, αλλά παρέχουν απλώς μια ένδειξη ([10]) του επιπέδου TEQ, εκφρασμένου σε BEQ, ώστε να λαμβάνεται υπόψη ότι είναι πιθανό κάποιες από τις ενώσεις που περιέχονται σε εκχύλισμα δείγματος και προκαλούν απόκριση στη δοκιμή να μην ικανοποιούν όλες τις απαιτήσεις της αρχής TEQ.

Οι μέθοδοι διαλογής και οι μέθοδοι επιβεβαίωσης μπορεί να εφαρμόζονται μόνο για τον έλεγχο συγκεκριμένης μήτρας αν είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να ανιχνεύουν με αξιόπιστο τρόπο συγκεντρώσεις στο όριο ανάληψης δράσης ή στο ανώτατο επίπεδο.

3. **Απαιτήσεις διασφάλισης ποιότητας**

3.1. Πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για την αποφυγή της διασταυρούμενης μόλυνσης σε κάθε στάδιο της διαδικασίας δειγματοληψίας και ανάλυσης.

3.2. Τα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται και να μεταφέρονται σε κατάλληλους για τον σκοπό αυτόν περιέκτες από γυαλί, αλουμίνιο, πολυπροπυλένιο ή πολυαιθυλένιο, έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε PCDD/F και σε παρόμοια με διοξίνες PCB. Πρέπει να αφαιρούνται τα ίχνη σκόνης χαρτιού από τον περιέκτη του δείγματος.

3.3. Η αποθήκευση και η μεταφορά των δειγμάτων πρέπει να διεξάγονται κατά τρόπο ώστε να διατηρείται η ακεραιότητα του δείγματος ζωοτροφής.

3.4. Εφόσον ενδείκνυται, κάθε εργαστηριακό δείγμα κονιοποιείται και αναμειγνύεται πλήρως με διαδικασία που αποδεδειγμένα επιτυγχάνει πλήρη ομογενοποίηση (π.χ. το κονιοποιημένο δείγμα να διέρχεται από κόσκινο 1 mm). Τα δείγματα πρέπει να αποξηραίνονται πριν από την κονιοποίηση, αν η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι πολύ υψηλή.

3.5. Πρέπει να διενεργείται έλεγχος των αντιδραστηρίων, των γυάλινων σκευών και του εξοπλισμού για το ενδεχόμενο να επηρεάζουν τα αποτελέσματα που βασίζονται στα TEQ ή τα BEQ.

3.6. Πρέπει να εκτελείται ανάλυση τυφλού δείγματος με τη διεξαγωγή ολόκληρης της αναλυτικής διαδικασίας, από την οποία παραλείπεται μόνο το δείγμα.

3.7. Για τις βιοαναλυτικές μεθόδους, πρέπει να εξακριβώνεται αν όλα τα γυάλινα σκεύη και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση είναι απαλλαγμένα από ενώσεις που παρεμποδίζουν την ανίχνευση των στοχευόμενων ενώσεων στο πεδίο τιμών εργασίας. Τα γυάλινα σκεύη εκπλένονται με διαλύτες ή θερμαίνονται σε θερμοκρασίες κατάλληλες για την απομάκρυνση από την επιφάνειά τους των ιχνών PCDD/F, παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων και παρεμποδιστικών ενώσεων.

3.8. Η ποσότητα των δειγμάτων που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση πρέπει να είναι αρκετή ώστε να πληρούνται οι απαιτήσεις όσον αφορά ένα επαρκώς χαμηλό πεδίο τιμών εργασίας, συμπεριλαμβανομένων των συγκεντρώσεων μέγιστων επιπέδων ή ορίων ανάληψης δράσης.

3.9. Κατά τις ειδικές διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για τα υπό εξέταση προϊόντα τηρούνται οι διεθνώς αποδεκτές κατευθυντήριες γραμμές, δηλαδή το πρότυπο EN ISO 6498.

4. **Απαιτήσεις για τα εργαστήρια**

4.1. Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 2017/625, η διαπίστευση των εργαστηρίων γίνεται από αναγνωρισμένο οργανισμό που λειτουργεί σύμφωνα με τον οδηγό ISO/IEC 58, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα εργαστήρια εφαρμόζουν μεθόδους διασφάλισης της ποιότητας. Η διαπίστευση των εργαστηρίων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025. Οι αρχές που περιγράφονται στις "Τεχνικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και τα όρια ποσοτικοποίησης για ανάλυση PCDD/F και PCB" τηρούνται ([11]).

4.2. Η επάρκεια των εργαστηρίων πρέπει να αποδεικνύεται με συνεχή επιτυχή συμμετοχή σε διεργαστηριακές μελέτες για τον προσδιορισμό των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB σε σχετικές μήτρες δείγματος ζωοτροφών και περιοχές συγκέντρωσης.

([10]) Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι δεν είναι ειδικές για εκείνες τις ομοειδείς ουσίες που περιλαμβάνονται στο σύστημα των TEF (συντελεστών τοξικής ισοδυναμίας). Άλλες ανάλογης δομής ενώσεις με δράση στους AhR (υποδοχείς αρυλικών υδρογονανθράκων) μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα και να συμβάλλουν στη συνολική απόκριση. Επομένως, τα βιοαναλυτικά αποτελέσματα δεν μπορούν να αποτελούν εκτίμηση, αλλά μάλλον ένδειξη του επιπέδου TEQ στο δείγμα.

([11]) "Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την αβεβαιότητα μέτρησης για εργαστήρια που διεξάγουν ανάλυση PCDD/F και PCB με φασματομετρία μάζας αραίωσης ισοτόπων" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), "Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την εκτίμηση LOD και LOQ για μετρήσεις στον τομέα των ζωοτροφών και των τροφίμων" (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

4.3. Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν μεθόδους διαλογής για έλεγχο δειγμάτων ρουτίνας συνεργάζονται στενά με τα εργαστήρια που εφαρμόζουν τη μέθοδο επιβεβαίωσης, τόσο για τον έλεγχο ποιότητας όσο και για την επιβεβαίωση του αναλυτικού αποτελέσματος των ύποπτων δειγμάτων.

5. **Βασικές απαιτήσεις που πρέπει να τηρεί μια αναλυτική διαδικασία για τις διοξίνες (PCDD/F) και τα παρόμοια με διοξίνες PCB**

5.1. *Χαμηλό εύρος εργασίας και όρια ποσοτικού προσδιορισμού*

Όσον αφορά τις PCDD/F, οι ανιχνεύσιμες ποσότητες πρέπει να είναι στην ανώτερη κλίμακα των φεμτογραμμαρίων (10^{-15}g) εξαιτίας της εξαιρετικής τοξικότητας ορισμένων από τις ενώσεις αυτές. Για τα περισσότερα ομοειδή PCB, ένα όριο ποσοτικού προσδιορισμού στο φάσμα των νανογραμμαρίων (10^{-9}g) είναι επαρκές. Για τη μέτρηση των πιο τοξικών παρόμοιων με διοξίνες ομοειδών PCB (ιδίως των μη ορθο-υποκατεστημένων ομοειδών ουσιών), το κατώτατο άκρο του πεδίου τιμών εργασίας πρέπει να φθάνει στη χαμηλότερη περιοχή της κλίμακας των πικογραμμαρίων (10^{-12}g). Για όλα τα υπόλοιπα συγγενή PCB, ένα όριο ποσοτικού προσδιορισμού στην κλίμακα των νανογραμμαρίων (10^{-9}g) είναι ήδη επαρκές.

5.2. *Υψηλή εκλεκτικότητα (ειδικότητα)*

5.2.1. Οι PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB πρέπει να διακρίνονται από πολλές άλλες ενώσεις που συνεκχυλίζονται και πιθανώς προκαλούν παρεμβολές, και οι οποίες είναι παρούσες σε συγκεντρώσεις έως και πολλές τάξεις μεγέθους υψηλότερες από εκείνες των υπό μελέτη προσδιοριζόμενων ουσιών. Για τις μεθόδους GC-MS είναι αναγκαία η διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων ομοειδών ουσιών, όπως μεταξύ των τοξικών (π.χ. τα δεκαεπτά υποκατεστημένα στις θέσεις 2,3,7,8 PCDD/F και τα δώδεκα παρόμοια με διοξίνες PCB) και των άλλων ομοειδών ουσιών.

5.2.2. Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν τις ενώσεις-στόχους ως το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB. Ο καθαρισμός των δειγμάτων αποσκοπεί στην αφαίρεση των ενώσεων που προκαλούν ψευδώς μη συμμορφούμενα αποτελέσματα ή των ενώσεων που μπορούν να μειώσουν την απόκριση, προκαλώντας ψευδώς συμμορφούμενα αποτελέσματα.

5.3. *Υψηλή ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα, φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας)*

5.3.1. Για τις μεθόδους GC-MS ο προσδιορισμός παρέχει έγκυρη εκτίμηση της αληθούς συγκέντρωσης σε ένα δείγμα. Η υψηλή ακρίβεια είναι αναγκαία για να αποφευχθεί η απόρριψη του αποτελέσματος της ανάλυσης του δείγματος λόγω χαμηλής αξιοπιστίας του προσδιορισμού του TEQ. Η ακρίβεια εκφράζεται ως *ορθότητα* (διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής που μετρήθηκε για μια προσδιοριζόμενη ουσία σε ένα πιστοποιημένο υλικό και της πιστοποιημένης τιμής του, που εκφράζεται ως ποσοστό της τιμής αυτής) και ως *πιστότητα* (RSD_R, σχετική τυπική απόκλιση που υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας).

5.3.2. Για τις βιοαναλυτικές μεθόδους, προσδιορίζεται η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας. Ως φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας νοείται το επίπεδο BEQ που υπολογίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης TCDD ή PCB 126 με διόρθωση για τυφλό και κατόπιν διαίρεση διά της τιμής TEQ που καθορίζεται με τη μέθοδο επιβεβαίωσης. Αποσκοπεί στη διόρθωση παραγόντων, όπως η απώλεια PCDD/F και παρόμοιων με διοξίνες ενώσεων κατά τα στάδια της εκχύλισης και του καθαρισμού, οι συνεκχυλιζόμενες ενώσεις που αυξάνουν ή μειώνουν την απόκριση (αγωνιστική και ανταγωνιστική δράση), η ποιότητα της προσαρμογής της καμπύλης ή οι διαφορές μεταξύ των τιμών TEF και σχετικής ισχύος (REP). Η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας υπολογίζεται από κατάλληλα δείγματα αναφοράς με αντιπροσωπευτικό προφίλ ομοειδών ουσιών κοντά στο επίπεδο που ενδιαφέρει.

5.4. *Επικύρωση στο εύρος του ανώτατου επιπέδου και γενικά μέτρα ελέγχου ποιότητας*

5.4.1. Τα εργαστήρια αποδεικνύουν την επίδοση μιας μεθόδου στην κλίμακα του ανώτατου επιπέδου, π.χ. 0,5, 1 και 2 φορές το ανώτατο επίπεδο, συμπεριλαμβανομένου ενός αποδεκτού συντελεστή μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες αναλύσεις, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επικύρωσης και της ανάλυσης ρουτίνας.

5.4.2. Τακτικές τυφλές δοκιμές και πειράματα εμβολιασμού των δειγμάτων ή ανάλυση δειγμάτων ελέγχου (κατά προτίμηση, εφόσον είναι διαθέσιμο, πιστοποιημένου υλικού αναφοράς) πρέπει να εκτελούνται ως μέτρα εσωτερικής διασφάλισης της ποιότητας. Διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου για τους τυφλούς ελέγχους, τα πειράματα εμβολιασμού και τις αναλύσεις δειγμάτων-μαρτύρων καταγράφονται και ελέγχονται ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι αναλυτικές επιδόσεις πληρούν τις απαιτήσεις.

5.5. *Όριο ποσοτικού προσδιορισμού*

5.5.1. Για μια βιοαναλυτική μέθοδο διαλογής ο καθορισμός του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση, αλλά πρέπει να αποδεικνύεται ότι η μέθοδος μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ της τιμής του τυφλού και της τιμής αποκοπής. Κατά την αναφορά του επιπέδου BEQ καθορίζεται ένα επίπεδο αναφοράς για τη διεκπεραίωση των δειγμάτων που εμφανίζουν απόκριση χαμηλότερη από αυτό το επίπεδο. Το επίπεδο αναφοράς πρέπει αποδεδειγμένα να είναι τουλάχιστον τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας, με απόκριση χαμηλότερη από το εύρος εργασίας. Επομένως, πρέπει να υπολογίζεται με βάση δείγματα που περιέχουν περίπου το απαιτούμενο ελάχιστο επίπεδο των στοχευόμενων ενώσεων και όχι με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο ή το τυφλό δοκιμασίας.

5.5.2. Το LOQ για μια μέθοδο επιβεβαίωσης αντιστοιχεί περίπου στο ένα πέμπτο του ανώτατου επιπέδου.

5.6. *Κριτήρια ανάλυσης*

Για αξιόπιστα αποτελέσματα από μεθόδους επιβεβαίωσης ή μεθόδους διαλογής πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου για την τιμή TEQ ή BEQ, αντίστοιχα, είτε αυτή προσδιορίζεται ως συνολικό TEQ ή ως συνολικό BEQ (ως το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB) είτε χωριστά για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB:

	Διαλογή με βιοαναλυτικές ή φυσικοχημικές μεθόδους	Μέθοδοι επιβεβαίωσης
Ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων (*)	< 5 %	
Ορθότητα		− 20 % έως + 20 %
Επαναληψιμότητα (RSD_r)	< 20 %	
Ενδιάμεση πιστότητα (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) Όσον αφορά τα ανώτατα επίπεδα.

5.7. *Ειδικές απαιτήσεις για μεθόδους διαλογής*

5.7.1. Για τη διαλογή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο οι μέθοδοι GC-MS όσο και βιοαναλυτικές μέθοδοι. Για τις μεθόδους GC-MS πρέπει να πληρούνται οι απαιτήσεις του σημείου 6. Για τις κυτταρικές βιοαναλυτικές μεθόδους καθορίζονται ειδικές απατήσεις στο σημείο 7.

5.7.2. Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν μεθόδους διαλογής για τον έλεγχο δειγμάτων ρουτίνας συνεργάζονται στενά με τα εργαστήρια που εφαρμόζουν τη μέθοδο επιβεβαίωσης.

5.7.3. Απαιτείται επαλήθευση της επίδοσης της μεθόδου διαλογής κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ρουτίνας, μέσω αναλυτικού ποιοτικού ελέγχου και διαρκούς επικύρωσης μεθόδου. Πρέπει να υπάρχει πρόγραμμα συνεχούς ελέγχου των συμμορφούμενων αποτελεσμάτων.

5.7.4. Έλεγχος για πιθανή καταστολή της κυτταρικής απόκρισης και της κυτταροτοξικότητας:

Το 20 % των εκχυλισμάτων δειγμάτων υποβάλλονται σε μέτρηση με διαλογή ρουτίνας χωρίς και με την προσθήκη 2,3,7,8-TCDD σε ποσότητα που αντιστοιχεί στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης, για να ελεγχθεί αν η απόκριση εξαλείφεται ενδεχομένως από παρεμποδιστές που βρίσκονται στο εκχύλισμα δείγματος. Η μετρούμενη συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος συγκρίνεται με το άθροισμα της συγκέντρωσης του μη εμβολιασμένου εκχυλίσματος και της συγκέντρωσης εμβολιασμού. Αν αυτή η μετρούμενη συγκέντρωση είναι χαμηλότερη από την υπολογισθείσα συγκέντρωση (άθροισμα) κατά ποσοστό άνω του 25 %, αυτό αποτελεί ένδειξη πιθανής καταστολής του σήματος, και το αντίστοιχο δείγμα πρέπει να υποβληθεί σε ανάλυση επιβεβαίωσης με GC-HRMS. Τα αποτελέσματα παρακολουθούνται σε διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου.

5.7.5. Ποιοτικός έλεγχος σε συμμορφούμενα δείγματα:

Περίπου το 2 % έως 10 % των συμμορφούμενων δειγμάτων, ανάλογα με τη μήτρα δείγματος και την εργαστηριακή πείρα, επιβεβαιώνονται με τη μέθοδο GC/HRMS.

5.7.6. Προσδιορισμός των ποσοστών ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων με βάση τα στοιχεία του ποιοτικού ελέγχου:

Προσδιορίζεται το ποσοστό των ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων από τη διαλογή των δειγμάτων κάτω και πάνω από το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης. Τα πραγματικά ποσοστά ψευδώς συμμορφούμενων πρέπει να είναι κάτω από 5 %. Όταν από τον ποιοτικό έλεγχο σε συμμορφούμενα δείγματα προκύπτουν τουλάχιστον 20 επιβεβαιωμένα αποτελέσματα ανά μήτρα/ομάδα μητρών δείγματος, τα συμπεράσματα για το ποσοστό των ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων εξάγονται από αυτά τα στοιχεία. Στον ελάχιστο αριθμό των 20 αποτελεσμάτων για την αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδώς συμμορφούμενων μπορούν να περιλαμβάνονται επίσης τα αποτελέσματα από δείγματα που έχουν αναλυθεί σε διεργαστηριακές δοκιμές ή κατά τη διάρκεια περιστατικών μόλυνσης και τα οποία καλύπτουν εύρος συγκεντρώσεων έως και, π.χ., το διπλάσιο του ανώτατου επιπέδου (ΜΕ). Τα δείγματα πρέπει να καλύπτουν τα συχνότερα προφίλ ομοειδών ουσιών και να αντιπροσωπεύουν διάφορες πηγές.

Παρ' ότι οι δοκιμασίες διαλογής αποσκοπούν κατά προτίμηση στην ανίχνευση δειγμάτων που υπερβαίνουν το όριο ανάληψης δράσης, το κριτήριο προσδιορισμού των ποσοστών των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης της μεθόδου επιβεβαίωσης.

5.7.7. Τα δυνητικώς μη συμμορφούμενα δείγματα από τη διαλογή επαληθεύονται πάντα με πλήρη εκ νέου ανάλυση του αρχικού δείγματος με μια μέθοδο επιβεβαίωσης. Τα εν λόγω δείγματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων. Για τις μεθόδους διαλογής το ποσοστό των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων αντιστοιχεί στο ποσοστό των αποτελεσμάτων των οποίων η συμμόρφωση επιβεβαιώνεται μέσω της ανάλυσης επιβεβαίωσης, ενώ τα αντίστοιχα δείγματα είχαν βρεθεί ενδεχομένως μη συμμορφούμενα κατά την προηγούμενη ανάλυση διαλογής. Η Η αξιολόγηση των πλεονεκτημάτων της μεθόδου διαλογής βασίζεται στη σύγκριση των ψευδώς μη συμμορφούμενων δειγμάτων με τον συνολικό αριθμό των ελεγχθέντων δειγμάτων. Αυτό το ποσοστό πρέπει να είναι τόσο χαμηλό ώστε η χρήση της μεθόδου διαλογής να είναι πλεονεκτική.

5.7.8. Υπό συνθήκες επικύρωσης, οι βιοαναλυτικές μέθοδοι πρέπει να παρέχουν έγκυρη ένδειξη του επιπέδου TEQ, υπολογισμένου και εκφρασμένου σε BEQ.

Επίσης, για τις βιοαναλυτικές μεθόδους που εκτελούνται σε επαναλαμβανόμενες συνθήκες η ενδοεργαστηριακή RSD_r είναι κατά κανόνα μικρότερη υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (RSD_R).

6. Ειδικές απαιτήσεις για μεθόδους GC-MS που πρέπει να τηρούνται για σκοπούς διαλογής ή επιβεβαίωσης

6.1. *Αποδεκτές διαφορές μεταξύ αποτελεσμάτων WHO-TEQ ανώτερου ορίου και κατώτερου ορίου*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων ανώτερου ορίου και κατώτερου ορίου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20 % για την επαλήθευση της υπέρβασης του ανώτατου επιπέδου ή, σε περίπτωση ανάγκης, των ορίων ανάληψης δράσης.

6.2. *Έλεγχος ανακτήσεων*

6.2.1. Η προσθήκη εσωτερικών προτύπων PCDD/F υποκατεστημένων από χλώριο στις θέσεις 2, 3, 7, 8 με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C και των εσωτερικών προτύπων παρόμοιων με τις διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C πραγματοποιείται πολύ νωρίς, στην αρχή της μεθόδου ανάλυσης, δηλαδή πριν από την εκχύλιση, για να επικυρωθεί η αναλυτική διαδικασία. Προστίθεται τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για καθεμία από τις ομόλογες ομάδες των τετρα- έως οκτα-χλωριωμένων ομόλογων ομάδων PCDD/F και τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για καθεμία από τις ομόλογες ομάδες των παρόμοιων με διοξίνες PCB (εναλλακτικά, τουλάχιστον μία ομοειδής ουσία για κάθε φασματομετρικά επιλεγμένη λειτουργία καταγραφής ιόντων που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB). Στην περίπτωση των μεθόδων επιβεβαίωσης, χρησιμοποιούνται και τα 17 εσωτερικά πρότυπα PCDD/F υποκατεστημένα στις θέσεις 2,3,7,8 με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C και τα 12 εσωτερικά πρότυπα παρόμοιων με τις διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C.

6.2.2. Πρέπει επίσης να προσδιοριστούν οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης για εκείνες τις ομοειδείς ουσίες για τις οποίες δεν προστίθεται κανένα ανάλογο με ισοτοπική επισήμανση ^{13}C, με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων διαλυμάτων βαθμονόμησης.

6.2.3. Για τις ζωοτροφές φυτικής προέλευσης και τις ζωοτροφές ζωικής προέλευσης που περιέχουν λιγότερο από 10 % λίπος, είναι υποχρεωτική η προσθήκη των εσωτερικών προτύπων πριν από την εκχύλιση. Για τις ζωοτροφές ζωικής προέλευσης που περιέχουν περισσότερο από 10 % λίπος, τα εσωτερικά πρότυπα μπορούν να προστίθενται είτε πριν είτε μετά την εκχύλιση του λίπους. Πραγματοποιείται κατάλληλη επικύρωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, ανάλογα με το στάδιο στο οποίο εισάγονται εσωτερικά πρότυπα.

6.2.4. Πριν από την ανάλυση GC-MS πρέπει να προστίθενται 1 ή 2 πρότυπα ανάκτησης (υποκατάστατα).

6.2.5. Απαιτείται έλεγχος της ανάκτησης. Για τις μεθόδους επιβεβαίωσης τα ποσοστά ανάκτησης των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να κυμαίνονται από 60 % έως 120 %. Χαμηλότερα ή υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για επιμέρους ομοειδείς ουσίες, ιδίως ορισμένες επτα- και οκτα-χλωριωμένες διβενζοδιοξίνες και διβενζοφουράνια, είναι αποδεκτά, υπό τον όρο ότι η συμμετοχή τους στην τιμή TEQ δεν υπερβαίνει το 10 % της συνολικής τιμής TEQ (με βάση το άθροισμα των PCDD/PCDF και των παρόμοιων με διοξίνες PCB). Για τις μεθόδους διαλογής GC-MS τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονται από 30 έως 140 %.

6.3. *Αφαίρεση παρεμποδιστών*

— Πραγματοποιείται διαχωρισμός των PCDD/F από τις παρεμποδίζουσες χλωριωμένες ενώσεις, όπως τα μη παρόμοια με διοξίνες PCB και τους χλωριωμένους διφαινυλικούς αιθέρες, μέσω κατάλληλων χρωματογραφικών τεχνικών (κατά προτίμηση με στήλη florisil, αλουμίνας και/ή άνθρακα).

— Κατά τον διαχωρισμό των ισομερών με αεριοχρωματογραφία η απόσταση μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν στα 1,2,3,4,7,8-HxCDF και 1,2,3,6,7,8-HxCDF πρέπει να είναι < 25 %).

6.4. *Βαθμονόμηση με πρότυπη καμπύλη*

Το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης πρέπει να καλύπτει το σχετικό εύρος του ανώτατου επιπέδου ή των ορίων ανάληψης δράσης.

6.5. *Ειδικά κριτήρια για τις μεθόδους επιβεβαίωσης*

— Για την GC-HRMS:

Στη μέθοδο HRMS η διακριτική ικανότητα πρέπει τυπικά να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 10 000 για ολόκληρο το πεδίο τιμών μάζας στο 10 % του ύψους των κορυφών.

Εκπλήρωση περαιτέρω κριτηρίων ταυτοποίησης και επιβεβαίωσης, όπως περιγράφεται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους EPA 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν.

— Για την GC-MS/MS:

Έλεγχος τουλάχιστον 2 ειδικών μητρικών ιόντων, καθενός με ένα συγκεκριμένο αντίστοιχο θυγατρικό ιόν μετάβασης για όλες τις επισημασμένες και μη επισημασμένες προσδιοριζόμενες ουσίες στο πεδίο εφαρμογής της ανάλυσης.

Μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή ανοχής των σχετικών εντάσεων ιόντων ± 15 % για επιλεγμένα θυγατρικά ιόντα μετάβασης σε σύγκριση με υπολογισμένες ή μετρημένες τιμές (μέσος όρος από πρότυπα βαθμονόμησης), με την εφαρμογή ίδιων συνθηκών MS/MS, ιδίως την ενέργεια σύγκρουσης και την πίεση αερίου σύγκρουσης, για κάθε μετάβαση μιας προσδιοριζόμενης ουσίας.

Η διακριτική ικανότητα για κάθε τετράπολο θα οριστεί ως ίση ή ανώτερη της διακριτικής ικανότητας μάζας μονάδας (διακριτική ικανότητα μάζας μονάδας: επαρκής διακριτική ικανότητα για τον διαχωρισμό δύο κορυφών ανά μία μονάδα μάζας) για την ελαχιστοποίηση πιθανών παρεμβολών στις προσδιοριζόμενες ουσίες που ενδιαφέρουν.

Εκπλήρωση περαιτέρω κριτηρίων όπως περιγράφονται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πρότυπα, για παράδειγμα στο πρότυπο EN 16215:2012 (Ζωοτροφές — Προσδιορισμός των διοξινών και των παρόμοιων με διοξίνες PCB με την τεχνική GC-HRMS και των δεικτών PCB με την τεχνική GC-HRMS) και/ή στις μεθόδους EPA 1613 και 1668 όπως αναθεωρήθηκαν, με εξαίρεση την υποχρέωση χρήσης GC-HRMS.

7. **Ειδικές απαιτήσεις για τις βιοαναλυτικές μεθόδους**

Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι είναι μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση βιολογικών αρχών όπως οι δοκιμασίες με βάση κύτταρα, οι δοκιμασίες με υποδοχείς ή οι ανοσοαναλυτικές δοκιμασίες. Το παρόν σημείο καθορίζει τις απαιτήσεις για βιοαναλυτικές μεθόδους γενικά.

Κατ' αρχήν μια μέθοδος διαλογής ταξινομεί ένα δείγμα ως συμμορφούμενο ή πιθανώς μη συμμορφούμενο. Για τον σκοπό αυτόν, το υπολογιζόμενο επίπεδο BEQ συγκρίνεται με την τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.3). Τα δείγματα κάτω από την τιμή αποκοπής δηλώνονται ως συμμορφούμενα· για τα δείγματα που βρίσκονται στην τιμή αποκοπής ή πάνω από αυτήν υπάρχει υπόνοια ότι δεν συμμορφώνονται και απαιτείται ανάλυση με μέθοδο επιβεβαίωσης. Στην πράξη, ένα επίπεδο BEQ που αντιστοιχεί στα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η πιο κατάλληλη τιμή αποκοπής που εξασφαλίζει ένα ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων κάτω από 5 % και ένα αποδεκτό ποσοστό για ψευδώς μη συμμορφούμενα αποτελέσματα Με χωριστά μέγιστα επίπεδα για PCDD/F και για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, ο έλεγχος της συμμόρφωσης των δειγμάτων χωρίς κλασμάτωση απαιτεί κατάλληλες τιμές αποκοπής για τη βιολογική δοκιμασία για τις PCDD/F Για τον έλεγχο των δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης ως τιμή αποκοπής λαμβάνεται ένα κατάλληλο ποσοστό του αντίστοιχου ορίου ανάληψης δράσης.

Αν ένα ενδεικτικό επίπεδο εκφράζεται σε BEQ, τα αποτελέσματα των δειγμάτων πρέπει να βρίσκονται εντός της περιοχής εργασίας και να υπερβαίνουν το όριο αναφοράς (βλέπε σημεία 7.1.1 και 7.1.6).

7.1. *Αξιολόγηση της απόκρισης στη δοκιμή*

7.1.1. Γενικές απαιτήσεις

— Κατά τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων σε μια καμπύλη βαθμονόμησης TCDD οι τιμές στο ανώτατο άκρο της καμπύλης θα δείχνουν σημαντική διακύμανση [μεγάλος συντελεστής μεταβλητότητας (CV)]. Η περιοχή εργασίας είναι η περιοχή στην οποία αυτός ο CV είναι μικρότερος από 15 %. Το κατώτατο άκρο της περιοχής εργασίας (όριο αναφοράς) ορίζεται τουλάχιστον σε επίπεδο τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας. Το ανώτατο άκρο της περιοχής εργασίας αντιπροσωπεύεται συνήθως από την τιμή EC_{70} (70 % της μέγιστης πραγματικής συγκέντρωσης), αλλά είναι σε χαμηλότερο επίπεδο αν ο CV είναι υψηλότερος από το 15 % σε αυτή την περιοχή. Η περιοχή εργασίας καθορίζεται κατά την επικύρωση. Η τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.3) πρέπει να βρίσκεται εντός της περιοχής εργασίας και μακριά από τα όριά της.

— Τα πρότυπα διαλύματα και τα εκχυλίσματα των δειγμάτων υποβάλλονται σε δοκιμασία εις τριπλούν, ή τουλάχιστον εις διπλούν. Σε περίπτωση δοκιμασιών εις διπλούν, ένα πρότυπο διάλυμα ή ένα εκχύλισμα-μάρτυρας που υποβάλλεται σε δοκιμή κατανεμημένο σε τέσσερις έως έξι θήκες σε όλη την πλάκα πρέπει να δίνει απόκριση ή συγκέντρωση (δυνατόν μόνο εντός της περιοχής εργασίας) με βάση CV < 15 %.

7.1.2. Βαθμονόμηση

7.1.2.1. Βαθμονόμηση με πρότυπη καμπύλη

— Τα επίπεδα στα δείγματα πρέπει να εκτιμώνται με σύγκριση της απόκρισης στη δοκιμή με μια καμπύλη βαθμονόμησης με TCDD (ή PCB 126 ή τυποποιημένο μείγμα PCDD/PCDF/παρόμοιων με διοξίνες PCB) για τον υπολογισμό του επιπέδου BEQ στο εκχύλισμα και κατόπιν στο δείγμα.

— Η καμπύλη βαθμονόμησης περιέχει 8 έως 12 συγκεντρώσεις (τουλάχιστον εις διπλούν), με επαρκή αριθμό συγκεντρώσεων στο χαμηλότερο τμήμα της καμπύλης (περιοχή εργασίας). Αποδίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποιότητα της προσαρμογής της καμπύλης στην περιοχή εργασίας. Οι τιμές R^2 καθαυτές έχουν μικρή ή καμία αξία για την εκτίμηση της καταλληλότητας της προσαρμογής σε μη γραμμική παλινδρόμηση. Επιτυγχάνεται καλύτερη προσαρμογή με την ελαχιστοποίηση της διαφοράς μεταξύ των υπολογιζόμενων και των παρατηρούμενων επιπέδων εντός της περιοχής εργασίας της καμπύλης (π.χ. με την εφαρμογή της μεθόδου των ελάχιστων τετραγώνων).

— Στη συνέχεια το εκτιμώμενο επίπεδο στο εκχύλισμα του δείγματος διορθώνεται ως προς το επίπεδο BEQ που υπολογίζεται για ένα τυφλό δείγμα μήτρας ή διαλύτη (για να ληφθούν υπόψη οι προσμείξεις από διαλύτες και χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν) και ως προς τη φαινόμενη ανάκτηση (που υπολογίζεται από το επίπεδο BEQ κατάλληλων δειγμάτων αναφοράς με αντιπροσωπευτικά προφίλ ομοειδών ουσιών κοντά στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης). Για να γίνει η διόρθωση ως προς την ανάκτηση, η φαινόμενη ανάκτηση πρέπει να βρίσκεται εντός της απαιτούμενης περιοχής τιμών (βλέπε σημείο 7.1.4). Τα δείγματα αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση ως προς την ανάκτηση πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις του σημείου 7.2.

7.1.2.2. Βαθμονόμηση με δείγματα αναφοράς

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιασμένη από τουλάχιστον τέσσερα δείγματα αναφοράς (βλέπε σημείο 7.2.4): ένα τυφλό δείγμα μήτρας συν τρία δείγματα αναφοράς με επίπεδα 0,5, 1,0 και 2,0 φορές το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πλέον ανάγκη για διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση εάν οι ιδιότητες της μήτρας των δειγμάτων αναφοράς εναρμονίζονται με εκείνες των άγνωστων δειγμάτων. Στην περίπτωση αυτή, η απόκριση της δοκιμής που αντιστοιχεί στα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου (βλέπε σημείο 7.3) μπορεί να υπολογιστεί άμεσα από τα δείγματα αυτά και να χρησιμοποιηθεί ως τιμή αποκοπής. Για τον έλεγχο των δειγμάτων που υπερβαίνουν τα όρια ανάληψης δράσης, ως τιμή αποκοπής λαμβάνεται ένα κατάλληλο ποσοστό των εν λόγω ορίων ανάληψης δράσης.

7.1.3. Ξεχωριστός προσδιορισμός των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB

Τα εκχυλίσματα μπορούν να διαχωριστούν σε κλάσματα που περιέχουν PCDD/F και παρόμοια με διοξίνες PCB, έτσι ώστε να αναφέρονται χωριστά τα επίπεδα TEQ των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB (σε BEQ). Η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης των PCB 126 χρησιμοποιείται κατά προτίμηση για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για το κλάσμα που περιέχει τα παρόμοια με διοξίνες PCB.

7.1.4. Φαινόμενες ανακτήσεις βιολογικής διαδικασίας

Η "φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής διαδικασίας" υπολογίζεται από κατάλληλα δείγματα αναφοράς με αντιπροσωπευτικά προφίλ ομοειδών ουσιών, περίπου στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης, και εκφράζεται ως ποσοστό του επιπέδου BEQ σε σύγκριση με το επίπεδο TEQ. Ανάλογα με τον τύπο της δοκιμασίας και το σύστημα TEF ([12]) που χρησιμοποιείται, οι διαφορές μεταξύ των συντελεστών TEF και REP για τα παρόμοια με διοξίνες PCB μπορούν να προκαλέσουν χαμηλά ποσοστά φαινόμενης ανάκτησης για τα παρόμοια με διοξίνες PCB σε σύγκριση με τις PCDD/F. Επομένως, σε περίπτωση ξεχωριστού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, οι ανακτήσεις βιολογικής δοκιμασίας πρέπει να είναι: για τα παρόμοια με διοξίνες PCB 20 % έως 60 % και για τις PCDD/F 50 % έως 130 % (αυτά τα εύρη τιμών ισχύουν για την καμπύλη βαθμονόμησης με TCDD). Επειδή η συμμετοχή των παρόμοιων με διοξίνες PCB στο άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών μητρών δείγματος και δειγμάτων, η φαινόμενη ανάκτηση βιολογικής δοκιμασίας για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB αντανακλά αυτά τα εύρη τιμών και κυμαίνεται μεταξύ 30 % και 130 %. Σε περίπτωση σημαντικής αναθεώρησης των τιμών TEF με επιπτώσεις για τη νομοθεσία της Ένωσης για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB, επιβάλλεται η αναθεώρηση αυτών των ευρών τιμών.

7.1.5. Έλεγχος των ποσοστών ανάκτησης για τον καθαρισμό

Η απώλεια ενώσεων κατά τη διάρκεια του καθαρισμού ελέγχεται κατά την επικύρωση. Ένα τυφλό δείγμα εμβολιασμένο με μείγμα των διαφόρων ομοειδών ουσιών υποβάλλεται σε καθαρισμό (n = 3 τουλάχιστον), και η ανάκτηση και η μεταβλητότητα ελέγχονται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης. Η ανάκτηση πρέπει να κυμαίνεται από 60 % έως 120 %, ιδίως για τις ομοειδείς ουσίες που συμμετέχουν σε ποσοστό πάνω από 10 % στο επίπεδο TEQ σε διάφορα μείγματα.

7.1.6. Όριο αναφοράς

Κατά τη δήλωση του επιπέδου BEQ πρέπει να καθορίζεται ένα όριο αναφοράς με βάση δείγματα με σχετική μήτρα που περιέχουν τυπικά προφίλ ομοειδών ουσιών, αλλά όχι από την καμπύλη βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων, εξαιτίας της μικρής πιστότητας στο κατώτατο άκρο της καμπύλης. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι επιδράσεις της εκχύλισης και του καθαρισμού. Το όριο αναφοράς ορίζεται τουλάχιστον σε επίπεδο τριπλάσιο εκείνου των τυφλών δειγμάτων διαδικασίας.

7.2. *Χρήση δειγμάτων αναφοράς*

7.2.1. Τα δείγματα αναφοράς αντιπροσωπεύουν τη μήτρα του δείγματος, τα προφίλ ομοειδών ουσιών και το εύρος συγκεντρώσεων για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB κοντά στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης.

7.2.2. Σε κάθε σειρά δοκιμών πρέπει να περιλαμβάνονται ένα τυφλό δείγμα μήτρας ή, αν αυτό δεν είναι δυνατόν, ένα τυφλό δείγμα διαδικασίας και ένα δείγμα αναφοράς στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης. Αυτά τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε εκχύλιση και δοκιμή ταυτόχρονα και υπό τις ίδιες συνθήκες. Το δείγμα αναφοράς πρέπει να παρουσιάζει μια σαφώς υψηλότερη απόκριση σε σύγκριση με το τυφλό δείγμα, ώστε να εξασφαλίζεται η καταλληλότητα της δοκιμής. Τα εν λόγω δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διόρθωση τυφλού και ανάκτησης.

7.2.3. Τα δείγματα αναφοράς που επιλέγονται για τη διόρθωση ως προς την ανάκτηση είναι αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων της δοκιμής, πράγμα που σημαίνει ότι τα προφίλ των ομοειδών ουσιών δεν επιτρέπεται να οδηγούν σε υποεκτίμηση των επιπέδων.

7.2.4. Μπορεί να συμπεριληφθούν πρόσθετα δείγματα αναφοράς με, π.χ., 0,5 και 2 φορές το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης, ώστε να καταδειχτεί η ορθή επίδοση της δοκιμασίας στην περιοχή που ενδιαφέρει για τον έλεγχο του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης. Αυτά τα δείγματα, συνδυασμένα, μπορούν να χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των επιπέδων BEQ στα δείγματα δοκιμών (βλέπε σημείο 7.1.2.2).

7.3. *Καθορισμός των τιμών αποκοπής*

Καθορίζεται η σχέση μεταξύ των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων σε BEQ και των αποτελεσμάτων της μεθόδου επιβεβαίωσης σε TEQ, π.χ. με πειράματα βαθμονόμησης με αντιστοίχιση μήτρας, που περιλαμβάνουν δείγματα αναφοράς εμβολιασμένα με 0, 0,5, 1 και 2 φορές το ΜΕ, με 6 επαναλήψεις για κάθε επίπεδο (n = 24). Οι διορθωτικοί συντελεστές (ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) μπορούν να εκτιμηθούν από αυτή τη σχέση, αλλά πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με το σημείο 7.2.2.

([12]) Οι τρέχουσες απαιτήσεις βασίζονται στα TEF που δημοσιεύτηκαν στο: M. Van den Berg et al, *Toxicol Sci* 93 (2), 223-241 (2006).

Καθορίζονται τιμές αποκοπής για τη διαπίστωση της συμμόρφωσης ενός δείγματος με τα ανώτατα επίπεδα ή, στην περίπτωση ελέγχου των ορίων ανάληψης δράσης, κατά περίπτωση, της συμμόρφωσης με τα αντίστοιχα ανώτατα επίπεδα ή με το όριο ανάληψης δράσης που έχουν καθοριστεί είτε μόνο για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB είτε για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB. Εκφράζονται από το *χαμηλότερο* άκρο της κατανομής των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (που διορθώνονται για τυφλό και ποσοστό ανάκτησης) τα οποία αντιστοιχούν στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης βάσει επιπέδου εμπιστοσύνης 95 %, με ποσοστό ψευδώς ανταποκρινόμενων < 5 %, και RSD_R < 25 %. Το όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης.

Η τιμή αποκοπής (σε BEQ) μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με μία από τις προσεγγίσεις που καθορίζονται στα σημεία 7.3.1, 7.3.2 και 7.3.3 (βλέπε διάγραμμα 1).

7.3.1. Χρήση της *χαμηλότερης* περιοχής του διαστήματος πρόβλεψης 95 % στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης

$$\text{Τιμή αποκοπής} = \mathrm{BEQ_{DL}} - \mathrm{s_{y,x}} \times \mathrm{t_{\alpha,f=m-2}}\sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \overline{x})^2/Q_{xx}}$$

όπου:

BEQ_{DL}	το BEQ που αντιστοιχεί στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης, καθώς είναι το ανώτατο επίπεδο, λαμβανομένης υπόψη της διευρυμένης αβεβαιότητας μέτρησης
$s_{y,x}$	τυπική απόκλιση των υπολοίπων
$t_{\alpha,f = m-2}$	ο συντελεστής Student (α = 5 %, f = βαθμοί ελευθερίας, μονόπλευρος)
m	συνολικός αριθμός σημείων βαθμονόμησης (δείκτης j)
n	αριθμός επαναλήψεων σε κάθε επίπεδο
x_i	συγκέντρωση δείγματος (σε TEQ) του σημείου βαθμονόμησης i που προσδιορίζεται με μια μέθοδο επιβεβαίωσης
$\overline{x}$	μέση τιμή των συγκεντρώσεων (σε TEQ) όλων των δειγμάτων βαθμονόμησης
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_1 - \overline{x})^2$	παράμετρος του αθροίσματος των τετραγώνων, i = δείκτης του σημείου βαθμονόμησης i

7.3.2. Υπολογισμός των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (με διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) πολλαπλής ανάλυσης (n ≥ 6) δειγμάτων μολυσμένων στο επίπεδο του ορίου απόφασης με τη μέθοδο επιβεβαίωσης, ως το *κατώτατο* άκρο της κατανομής των δεδομένων που αντιστοιχούν στη μέση τιμή BEQ:

$$\text{Τιμή αποκοπής} = \mathrm{BEQ_{DL}} - 1,64 \times \mathrm{SD_R}$$

όπου:

SD_R	τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων των βιολογικών δοκιμασιών σε BEQ_{DL}, μετρημένα σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας εντός εργαστηρίου

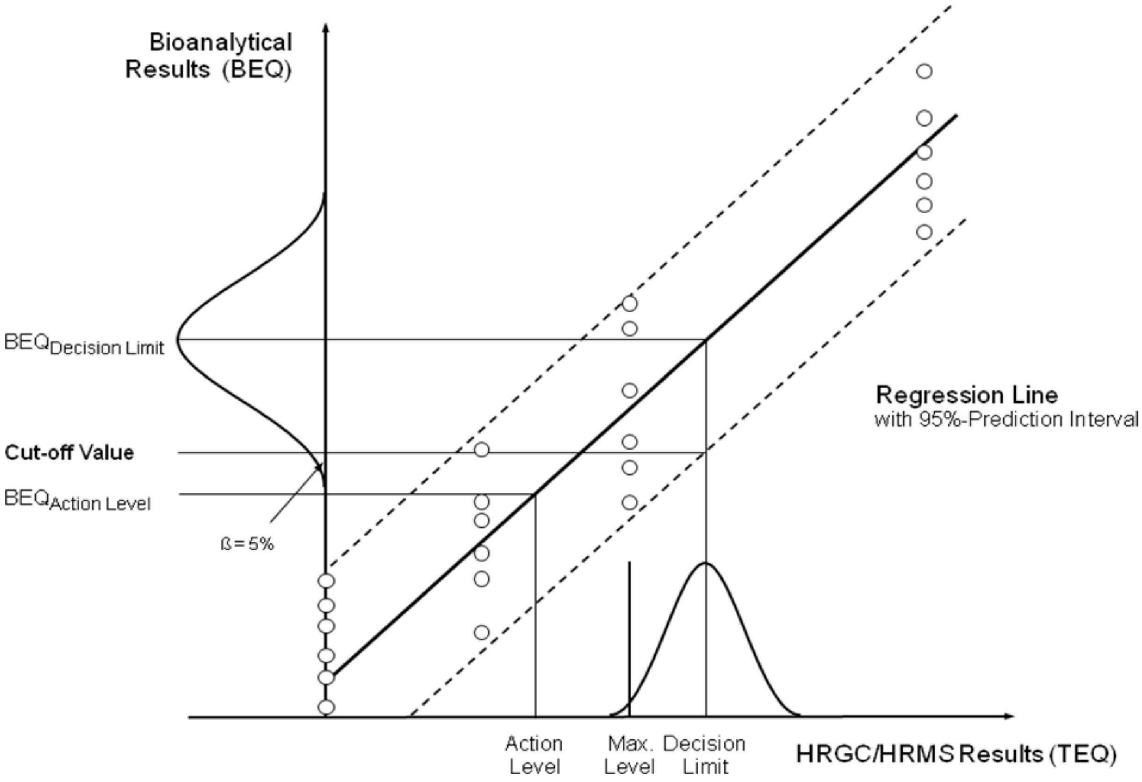
7.3.3. Υπολογισμός ως μέση τιμή των βιοαναλυτικών αποτελεσμάτων (σε BEQ, με διόρθωση ως προς το τυφλό και την ανάκτηση) από πολλαπλή ανάλυση (n ≥ 6) δειγμάτων μολυσμένων σε επίπεδο ίσο με τα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης· αυτή η διαδικασία βασίζεται στην παρατήρηση ότι αυτό το επίπεδο θα είναι περίπου η τιμή αποκοπής που προσδιορίζεται στο σημείο 7.3.1 ή στο σημείο 7.3.2:

Ο υπολογισμός των τιμών αποκοπής με βάση επίπεδο εμπιστοσύνης 95 %, με ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων < 5 % και RSD_R < 25 %:

(1) από το *κατώτατο* σημείο του διαστήματος πρόβλεψης 95 % στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης,

(2) από πολλαπλή ανάλυση (n ≥ 6) δειγμάτων μολυσμένων στο όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης ως το *κατώτατο* άκρο της κατανομής των δεδομένων (που απεικονίζεται στο διάγραμμα 1 με κωδωνοειδή καμπύλη) στην αντίστοιχη μέση τιμή BEQ.

Διάγραμμα 1



7.3.4. Περιορισμοί των τιμών αποκοπής:

Οι τιμές αποκοπής βάσει των BEQ που υπολογίζονται από την RSD_R και επιτυγχάνονται κατά την επικύρωση με τη χρήση περιορισμένου αριθμού δειγμάτων με διαφορετική μήτρα/προφίλ ομοειδών ουσιών μπορεί να είναι υψηλότερες από τα ανώτατα επίπεδα ή τα όρια ανάληψης δράσης βάσει των TEQ λόγω της μεγαλύτερης πιστότητας από εκείνη που επιτυγχάνεται συνήθως όταν πρέπει να ελεγχθεί ένα άγνωστο φάσμα πιθανών προφίλ ομοειδών ουσιών. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι τιμές αποκοπής υπολογίζονται από μια RSD_R = 25 %, ή προτιμώνται τα δύο τρίτα του ανώτατου επιπέδου ή του ορίου ανάληψης δράσης.

7.4. *Χαρακτηριστικά επιδόσεων*

7.4.1. Δεδομένου ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εσωτερικά πρότυπα σε βιοαναλυτικές μεθόδους, πραγματοποιούνται δοκιμές επαναληψιμότητας για να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την τυπική απόκλιση εντός σειράς δοκιμών και μεταξύ σειρών δοκιμών. Η επαναληψιμότητα πρέπει να είναι κάτω από 20 % και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα κάτω από 25 %. Αυτά βασίζονται στα υπολογιζόμενα επίπεδα σε BEQ μετά τη διόρθωση τυφλού και ποσοστού ανάκτησης.

7.4.2. Στο πλαίσιο της διαδικασίας επικύρωσης πρέπει να αποδεικνύεται ότι η δοκιμή μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ ενός τυφλού δείγματος και ενός επιπέδου ίσου με την τιμή αποκοπής, επιτρέποντας έτσι την ταυτοποίηση των δειγμάτων που υπερβαίνουν την αντίστοιχη τιμή αποκοπής (βλέπε σημείο 7.1.2).

7.4.3. Ορίζονται οι ενώσεις-στόχοι, οι πιθανές παρεμποδίσεις και τα μέγιστα ανεκτά επίπεδα τυφλού.

7.4.4. Η επί τοις εκατό τυπική απόκλιση της απόκρισης ή της συγκέντρωσης, που υπολογίζεται με βάση την απόκριση (είναι δυνατό μόνον εντός της περιοχής τιμών εργασίας) σε τριπλό προσδιορισμό με εκχύλισμα δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 %.

7.4.5. Τα μη διορθωμένα αποτελέσματα για το (τα) δείγμα(-τα) αναφοράς, σε BEQ (τυφλό και στο ανώτατο επίπεδο ή στο όριο ανάληψης δράσης), χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επίδοσης της βιοαναλυτικής μεθόδου για σταθερή περίοδο.

7.4.6. Τα διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου για τα τυφλά δείγματα διαδικασίας και κάθε είδος δείγματος αναφοράς καταγράφονται και ελέγχονται ώστε να εξασφαλίζεται ότι η αναλυτική επίδοση είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις, ιδίως όσον αφορά την απαιτούμενη ελάχιστη διαφορά από το κατώτατο άκρο της περιοχής τιμών εργασίας για τα τυφλά δείγματα διαδικασίας και όσον αφορά την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα για τα δείγματα αναφοράς. Τα τυφλά δείγματα διαδικασίας πρέπει να ελέγχονται κατά τρόπον ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς συμμορφούμενα αποτελέσματα κατά την αφαίρεση των επιπέδων των δειγμάτων αυτών.

7.4.7. Τα αποτελέσματα από τις μεθόδους επιβεβαίωσης των δειγμάτων για τα οποία υπάρχει υπόνοια ότι δεν συμμορφώνονται και του 2 % έως 10 % των δειγμάτων που συμμορφώνονται (τουλάχιστον 20 δείγματα ανά μήτρα δείγματος) συγκεντρώνονται και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της επίδοσης της μεθόδου διαλογής και της σχέσης μεταξύ BEQ και TEQ. Αυτή η βάση δεδομένων μπορεί να χρησιμοποιείται για την επαναξιολόγηση των τιμών αποκοπής που εφαρμόζονται στα δείγματα ρουτίνας για τις επικυρωμένες μήτρες.

7.4.8. Η επιτυχής επίδοση μιας μεθόδου μπορεί επίσης να αποδειχθεί με τη συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές. Τα αποτελέσματα από τα δείγματα που αναλύονται στις διεργαστηριακές δοκιμές και καλύπτουν εύρος συγκεντρώσεων έως και, π.χ., το διπλάσιο του ανώτατου επιπέδου, μπορούν επίσης να συμπεριλαμβάνονται στην αξιολόγηση του ποσοστού των ψευδοσυμμορφούμενων αποτελεσμάτων, εφόσον ένα εργαστήριο είναι σε θέση να αποδείξει την επιτυχή του επίδοση. Τα δείγματα πρέπει να καλύπτουν τα συχνότερα προφίλ ομοειδών ουσιών και να αντιπροσωπεύουν διάφορες πηγές.

7.4.9. Κατά τη διάρκεια των περιστατικών οι τιμές αποκοπής μπορούν να αξιολογηθούν εκ νέου, και να αντανακλούν την ειδική μήτρα και το ειδικό προφίλ ομοειδών ουσιών αυτού του συγκεκριμένου περιστατικού.

8. **Αναφορά των αποτελεσμάτων**

8.1. *Μέθοδοι επιβεβαίωσης*

8.1.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιέχουν τα επίπεδα των μεμονωμένων ομοειδών ουσιών των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και οι τιμές TEQ αναφέρονται ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο, προκειμένου να περιλαμβάνουν τον ανώτατο αριθμό πληροφοριών στην αναφορά των αποτελεσμάτων και να διευκολύνεται έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τις ειδικές απαιτήσεις.

8.1.2. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

8.1.3. Οι ανακτήσεις των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να καθίστανται διαθέσιμες στην περίπτωση που οι ανακτήσεις είναι εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 6.2.5, στην περίπτωση που υπερβαίνεται το ανώτατο επίπεδο (στην περίπτωση αυτή, οι ανακτήσεις για μία από τις δύο αναλύσεις εις διπλούν) και σε άλλες περιπτώσεις κατόπιν σχετικής αίτησης.

8.1.4. Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης πρέπει να αναφέρεται, επειδή η παράμετρος αυτή πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν κρίνεται αν ένα δείγμα συμμορφώνεται ή όχι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να αναφέρονται ως “x +/– U”, όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης, χρησιμοποιώντας συντελεστή κάλυψης 2, ο οποίος δίνει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %. Σε περίπτωση χωριστού προσδιορισμού των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB, πρέπει να χρησιμοποιείται για το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB το άθροισμα των εκτιμήσεων της διευρυμένης αβεβαιότητας των χωριστών αναλυτικών αποτελεσμάτων για τις PCDD/F και τα παρόμοια με διοξίνες PCB.

8.1.5. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ.

8.2. *Βιοαναλυτικές μέθοδοι διαλογής*

8.2.1. Το αποτέλεσμα της διαλογής εκφράζεται ως “συμμορφούμενο” ή “πιθανώς μη συμμορφούμενο” (“ύποπτο”).

8.2.2. Επιπλέον, μπορεί να αναφέρεται ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα για τις PCDD/F και/ή τα παρόμοια με διοξίνες PCB, εκφρασμένο σε BEQ (και όχι TEQ).

8.2.3. Τα δείγματα με απόκριση χαμηλότερη από το όριο αναφοράς αναφέρονται με την ένδειξη “κάτω από το όριο αναφοράς”. Τα δείγματα με απόκριση πάνω από την περιοχή τιμών εργασίας δηλώνονται ως “πάνω από την περιοχή τιμών εργασίας” και το επίπεδο που αντιστοιχεί στο άνω άκρο της περιοχής τιμών εργασίας πρέπει να δίνεται σε BEQ.

8.2.4. Για κάθε είδος μήτρας δείγματος η έκθεση αναφέρει το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης στο οποίο βασίζεται η αξιολόγηση.

8.2.5. Η έκθεση αναφέρει τον τύπο της εφαρμοζόμενης δοκιμής, τη βασική αρχή της και το είδος της βαθμονόμησης.

8.2.6. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

8.2.7. Στην περίπτωση δειγμάτων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι μη συμμορφούμενα, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει σημείωση σχετικά με τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν. Η συγκέντρωση των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στα δείγματα με υψηλά επίπεδα πρέπει να προσδιοριστεί/επιβεβαιωθεί με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.

8.2.8. Τα μη συμμορφούμενα αποτελέσματα δηλώνονται μόνο μέσω της ανάλυσης επιβεβαίωσης.

8.3. *Φυσικοχημικές μέθοδοι διαλογής*

8.3.1. Το αποτέλεσμα της διαλογής εκφράζεται ως “συμμορφούμενο” ή “πιθανώς μη συμμορφούμενο” (“ύποπτο”).

8.3.2. Για κάθε είδος μήτρας δείγματος η έκθεση αναφέρει το ανώτατο επίπεδο ή το όριο ανάληψης δράσης στο οποίο βασίζεται η αξιολόγηση.

8.3.3. Επιπλέον, μπορεί να δίνονται τα επίπεδα των μεμονωμένων ομοειδών ουσιών των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB και οι τιμές TEQ ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ.

8.3.4. Οι ανακτήσεις των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων πρέπει να καθίστανται διαθέσιμες στην περίπτωση που οι ανακτήσεις είναι εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 6.2.5, στην περίπτωση που υπερβαίνεται το ανώτατο επίπεδο (στην περίπτωση αυτή, οι ανακτήσεις για μία από τις δύο αναλύσεις εις διπλούν) και σε άλλες περιπτώσεις κατόπιν σχετικής αίτησης.

8.3.5. Η έκθεση αναφέρει τη μέθοδο GC-MS που εφαρμόζεται.

8.3.6. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB.

8.3.7. Στην περίπτωση δειγμάτων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι μη συμμορφούμενα, η έκθεση πρέπει να περιλαμβάνει σημείωση σχετικά με τα μέτρα που πρέπει να ληφθούν. Η συγκέντρωση των PCDD/F και το άθροισμα των PCDD/F και των παρόμοιων με διοξίνες PCB στα δείγματα με υψηλά επίπεδα πρέπει να προσδιοριστεί/επιβεβαιωθεί με μια μέθοδο επιβεβαίωσης.

8.3.8. Η μη συμμόρφωση μπορεί να αποφασίζεται μόνον έπειτα από ανάλυση επιβεβαίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΊΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΆΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΑΙΤΉΣΕΙς ΓΙΑ ΤΙς ΜΕΘΌΔΟΥς ΑΝΆΛΥΣΗς ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΎΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΠΊΣΗΜΟ ΈΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΕΠΙΠΈΔΩΝ ΤΩΝ ΜΗ ΠΑΡΌΜΟΙΩΝ ΜΕ ΔΙΟΞΊΝΕς PCB ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΈς

1. **Πεδίο εφαρμογής**

Οι απαιτήσεις που καθορίζονται στο παρόν κεφάλαιο εφαρμόζονται στις αναλύσεις ζωοτροφών για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB καθώς και όσον αφορά την προετοιμασία δειγμάτων και τις αναλυτικές απαιτήσεις για άλλους κανονιστικούς σκοπούς, στους οποίους περιλαμβάνονται οι έλεγχοι που εκτελούνται από τον υπεύθυνο της επιχείρησης ζωοτροφών για να εξασφαλιστεί η συμμόρφωση με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 183/2005.

2. **Εφαρμοζόμενες μέθοδοι ανίχνευσης**

Αεριοχρωματογραφία / Ανίχνευση σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ή ισοδύναμες μέθοδοι.

3. **Ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των προσδιοριζόμενων ουσιών που ενδιαφέρουν**

3.1. Ο σχετικός χρόνος κατακράτησης σε σχέση με τα εσωτερικά πρότυπα ή πρότυπα αναφοράς (αποδεκτή απόκλιση +/– 0,25 %).

3.2. Ο διαχωρισμός με αεριοχρωματογραφία των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB από παρεμποδιστές, κυρίως συνεκλουόμενα PCB, ιδίως αν τα επίπεδα των δειγμάτων είναι στο επίπεδο των νόμιμων ορίων και πρέπει να επιβεβαιωθεί η μη συμμόρφωση ([13]).

3.3. Απαιτήσεις για τις τεχνικές GC-MS

Παρακολούθηση τουλάχιστον του ακόλουθου αριθμού μοριακών ιόντων ή χαρακτηριστικών ιόντων από τη μοριακή συστάδα:

α) δύο ειδικών ιόντων για την HRMS·

β) τριών ειδικών ιόντων για την LRMS·

γ) δύο ειδικών μητρικών ιόντων, καθένα με ένα συγκεκριμένο αντίστοιχο θυγατρικό ιόν μετάβασης για MS-MS.

Μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές ανοχής για τους λόγους αφθονίας των επιλεγμένων θραυσμάτων μαζών:

Η σχετική απόκλιση του λόγου αφθονίας των επιλεγμένων θραυσμάτων μαζών από τη θεωρητική αφθονία ή το πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης για στοχευόμενο ιόν (το πιο πολυπληθές ιόν που παρακολουθείται) και προσδιοριστικό/-ά ιόν/ιόντα): ± 15 %.

3.4. Απαιτήσεις για τις τεχνικές GC/ECD

Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που υπερβαίνουν το ανώτατο επίπεδο με δύο στήλες GC με στατικές φάσεις διαφορετικής πολικότητας.

4. **Απόδειξη της επίδοσης της μεθόδου**

Επικύρωση της επίδοσης της μεθόδου στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου (0,5 έως 2 φορές το ανώτατο επίπεδο) με αποδεκτό συντελεστή μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες αναλύσεις (βλέπε απαιτήσεις για ενδιάμεση ακρίβεια στο σημείο 9).

5. **'Οριο ποσοτικού προσδιορισμού**

Το άθροισμα των LOQ ([14]) των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB δεν είναι υψηλότερο από το ένα τρίτο του ανώτατου επιπέδου ([15]).

6. **'Έλεγχος ποιότητας**

Τακτικοί έλεγχοι τυφλών δειγμάτων, αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων, δείγματα ποιοτικού ελέγχου, συμμετοχή σε διεργαστηριακές μελέτες για σχετικές μήτρες.

7. **'Έλεγχος ανακτήσεων**

7.1. Χρήση κατάλληλων εσωτερικών προτύπων με φυσικοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με των προσδιοριζόμενων ουσιών που ενδιαφέρουν.

7.2. Προσθήκη εσωτερικών προτύπων:

Προσθήκη στα προϊόντα (πριν από τη διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού).

7.3. Οι απαιτήσεις για τις μεθόδους που χρησιμοποιούν και τα έξι ομοειδή μη παρόμοια με διοξίνες PCB με ισοτοπική επισήμανση:

α) διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων·

β) ανακτήσεις των εσωτερικών προτύπων με ισοτοπική επισήμανση από 60 % έως 120 %·

γ) είναι αποδεκτά χαμηλότερα ή υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για τις επιμέρους ομοειδείς ουσίες με συμμετοχή στο άθροισμα των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB μικρότερη από 10 %.

([13]) Ομοειδείς ουσίες που διαπιστώνεται συχνά ότι είναι συνεκλουόμενες είναι, παραδείγματος χάρη, τα PCB 28/31, PCB 52/69 και PCB 138/163/164. Για τη μέθοδο GC-MS επίσης λαμβάνονται υπόψη πιθανές παρεμποδίσεις από θραύσματα ομοειδών ουσιών ανώτερου βαθμού χλωριώσεως.

([14]) Οι αρχές όπως περιγράφονται στο "Έγγραφο καθοδήγησης σχετικά με την εκτίμηση LOD και LOQ για μετρήσεις στον τομέα των μολυντών των ζωοτροφών και των τροφίμων" (https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931) τηρούνται, κατά περίπτωση.

([15]) Συνιστάται ιδιαιτέρως η συμμετοχή του σήματος του τυφλού δείγματος να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλά σε σχέση με το επίπεδο ενός μολυντή σε ένα δείγμα. Ο έλεγχος της μεταβλητότητας των επιπέδων τυφλού, κυρίως αν τα επίπεδα τυφλού αφαιρούνται από το αποτέλεσμα, αποτελεί αρμοδιότητα του εργαστηρίου.

7.4. Οι απαιτήσεις για τις μεθόδους που δεν χρησιμοποιούν και τα έξι εσωτερικά πρότυπα με ισοτοπική επισήμανση ή άλλα εσωτερικά πρότυπα:

α) έλεγχος της ανάκτησης του/των εσωτερικού/-ών προτύπου/προτύπων για κάθε δείγμα·

β) ανακτήσεις των εσωτερικών προτύπων από 60 % έως 120 %·

γ) διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση των εσωτερικών προτύπων.

7.5. Οι ανακτήσεις των ομοειδών ουσιών ελέγχονται με εμβολιασμένα δείγματα ή δείγματα ποιοτικού ελέγχου με συγκεντρώσεις στην περιοχή του ανώτατου επιπέδου. Τα ποσοστά ανάκτησης γι' αυτές τις ομοειδείς ουσίες θεωρούνται αποδεκτά εάν κυμαίνονται μεταξύ 60 % και 120 %.

8. **Απαιτήσεις για τα εργαστήρια**

Σύμφωνα με τις διατάξεις του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 2017/625, η διαπίστευση των εργαστηρίων γίνεται από αναγνωρισμένο οργανισμό που λειτουργεί σύμφωνα με τον οδηγό ISO/IEC 58, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τα εργαστήρια εφαρμόζουν μεθόδους διασφάλισης της ποιότητας. Η διαπίστευση των εργαστηρίων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025. Επιπλέον, τηρούνται οι αρχές που περιγράφονται στις "Τεχνικές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και τα όρια ποσοτικοποίησης για ανάλυση PCDD/F και PCB" τηρούνται ([16]).

9. **Χαρακτηριστικά επιδόσεων: κριτήρια για το σύνολο των μη παρόμοιων με διοξίνες PCB στο ανώτατο επίπεδο**

	Φασματομετρία μάζας αραίωσης ισοτόπων (*)	Άλλες τεχνικές
Ορθότητα	– 20 έως + 20 %	– 30 έως + 30 %
Ενδιάμεση πιστότητα (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Διαφορά μεταξύ άνω φραγμένου και κάτω φραγμένου υπολογισμού	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Χρήση και των έξι αναλόγων με επισήμανση ^{13}C ως απαιτούμενων εσωτερικών προτύπων.

10. **Αναφορά των αποτελεσμάτων**

10.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης περιλαμβάνουν τα επίπεδα των μεμονωμένων μη παρόμοιων με διοξίνες PCB και το άθροισμα των εν λόγω ομοειδών ουσιών PCB, ως κατώτερο όριο, ανώτερο όριο και ενδιάμεσο όριο, προκειμένου να παρέχονται όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες στην αναφορά των αποτελεσμάτων και να διευκολύνεται έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τις ειδικές απαιτήσεις.

10.2. Η έκθεση περιλαμβάνει τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την εκχύλιση των PCB.

10.3. Τα ποσοστά ανάκτησης των επιμέρους εσωτερικών προτύπων πρέπει να αναφέρονται σε περίπτωση που βρίσκονται εκτός του εύρους που αναφέρεται στο σημείο 7, σε περίπτωση υπέρβασης του ανώτατου επιπέδου, καθώς και σε άλλες περιπτώσεις, κατόπιν σχετικής αίτησης.

10.4. Η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης πρέπει να αναφέρεται, επειδή η εν λόγω παράμετρος πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν κρίνεται αν ένα δείγμα συμμορφώνεται ή όχι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να αναφέρονται ως "x +/– U", όπου x είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης και U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα μέτρησης, χρησιμοποιώντας συντελεστή κάλυψης 2, ο οποίος δίνει επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.

10.5. Τα αποτελέσματα εκφράζονται στις ίδιες μονάδες και με τον ίδιο (τουλάχιστον) αριθμό σημαντικών ψηφίων όπως τα ανώτατα επίπεδα που καθορίζονται στην οδηγία 2002/32/ΕΚ.

([16]) Βλέπε υποσημείωση 9.

Β. ΠΡΟΤΥΠΑ ΕΝ

Για την εφαρμογή του άρθρου 34 παράγραφος 2 στοιχείο α) του κανονισμού (ΕΕ) 2017/625 είναι συναφή τα ακόλουθα πρότυπα ΕΝ:

ΕΝ 17194 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε δεσοξυνιβαλενόλη, αφλατοξίνη Β1, φυμονισίνη Β1 & Β2, τοξίνες Τ-2 & ΗΤ-2, ζεαραλενόνη και ωχρατοξίνη Α στα συστατικά και σύνθετες ζωοτροφές με υγρή χρωματογραφία μάζας (LC-MS/M)

ΕΝ 17270 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε θεοβρωμίνη, συστατικών και σύνθετων ζωοτροφών συμπεριλαμβανομένων των συστατικών κακάου, με υγρή χρωματογραφία

ΕΝ 17504 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης. Προσδιορισμός της γκοσσυπόλης σε βαμβακόσπορο και ζωοτροφές με LC-MS/MS

ΕΝ 17362 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός της πενταχλωροθαινόλης (PCP) στα υλικά ζωοτροφών και σύνθετες ζωοτροφές με LC-MS/MS

ΕΝ 16279 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε φθόριο μετά από επεξεργασία με υδροχλωρικό οξύ με τη μέθοδο ιοντο-ευαίσθητων ηλεκτροδίων (ISE)

ΕΝ 17053 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός ιχνοστοιχείων, βαρέων μετάλλων και άλλων στοιχείων με ICP-MS (μέθοδος πολλαπλών στοιχείων)

ΕΝ 15550 Ζωοτροφές — Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε κάδμιο και μόλυβδο με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σε κλίβανο γραφίτη (GF-AAS) μετά από χώνευση υπό πίεση

ΕΝ 16206 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός αρσενικού με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σχηματισμού υδριδίων (HGAAS) μετά από χώνευση μικροκυμάτων υπό πίεση (εκχύλιση με νιτρικό οξύ 65 % και υπεροξείδιο του υδρογόνου 30 %)

ΕΝ 16277 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός υδραργύρου με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης ψυχρού ατμού (CVAAS) μετά από χώνευση μικροκυμάτων (εκχύλιση με νιτρικό οξύ 65 % και υπεροξείδιο υδρογόνου 30 %)

ΕΝ 16278 Ζωοτροφές — Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σχηματισμού υδριδίων (HG-AAS) μετά από εκχύλιση με μικροκύματα και διαχωρισμό εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)

ΕΝ 17374 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού σε ζωοτροφές HPLC-ICP-MS ανταλλαγής ανιόντων»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΤΡΟΦΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗΣ ΑΞΙΑΣ

Η ενεργητική αξία των συνθέτων τροφών που προορίζονται για πουλερικά υπολογίζεται με τον τύπο που βασίζεται στα ποσοστά ορισμένων αναλυτικών συστατικών των τροφών· η αξία αυτή εκφράζεται σε megajoules (MJ), μεταβολίσιμης ενέργειας (ME), διορθωμένης σε άζωτο, ανά χιλιόγραμμο σύνθετης τροφής ως έχει:

MJ/kg ME = 0,1551 × % ακατέργαστης πρωτεΐνης + 0,3431 × % ακατέργαστες λιπαρές ουσίες + 0,1669 × % άμυλο + 0,1301 × % ολικά ζάχαρα (εκφρασμένα σε σακχαρόζη).

2. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΔΗΛΩΘΕΙΣΕΣ ΑΞΙΕΣ

Εάν, μετά από τους επισήμους ελέγχους διαπιστώνεται διαφορά μεταξύ του αποτελέσματος του ελέγχου και της ενεργειακής αξίας που έχει δηλωθεί, η οποία συνιστά αύξηση ή μείωση της ενεργειακής αξίας της τροφής, εφαρμόζεται ανοχή της μεταβολίσιμης ενέργειας κατά 0,4 MJ/kg ME.

3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από την εφαρμογή του ανωτέρω τύπου δηλώνεται με προσέγγιση ενός δεκαδικού ψηφίου.

4. ΤΡΟΠΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η δειγματοληψία της σύνθετης τροφής και οι περιεκτικότητες σε αναλυτικά συστατικά που δηλώνονται στη μέθοδο υπολογισμού πραγματοποιούνται αντίστοιχα ανάλογα με τις ενωσιακές μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών.

Εφαρμόζεται:

— για την περιεκτικότητα σε ακατέργαστες λιπαρές ουσίες: η διαδικασία Β της μεθόδου για τον προσδιορισμό των ακατέργαστων ελαίων και λιπών, όπως ορίζεται στο μέρος Ζ του παραρτήματος III·

— για τις περιεκτικότητες σε άμυλο: η διαθλασματική μέθοδος, όπως ορίζεται στο μέρος ΙΑ του παραρτήματος III.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΓΑΤΕΣ ΚΑΙ ΣΚΥΛΟΥΣ

Η ενεργειακή αξία των πρώτων υλών ζωοτροφών και των σύνθετων ζωοτροφών για γάτες και σκύλους πρέπει να υπολογίζεται σύμφωνα με το πρότυπο EN 16967 Ζωοτροφές: Μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης — Εξισώσεις πρόβλεψης μεταβολίσιμης ενέργειας σε πλήρεις και συμπληρωματικές τροφές για γάτες και σκύλους (τροφές για ζώα συντροφιάς) (συμπεριλαμβανομένης διαιτητικής τροφής)».