II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΝΔΕΚΑΤΗ ΟΔΗΓΙΑ 93/70/ΕΟΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 28ης Ιουλίου 1993

για καθορισμό των κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

την οδηγία 70/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1970 περί εισαγωγής τρόπων λήψεως δειγμάτων και μεθόδων κοινοτικής αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3768/85 [2], και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι η οδηγία 70/373/ΕΟΚ προβλέπει ότι οι επίσημοι έλεγχοι των ζωοτροφών που αποσκοπούν στο να διαπιστωθεί κατά πόσον τηρούνται οι όροι που επιβάλλονται δυνάμει των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων όσον αφορά την ποιότητα και τη σύσταση των ζωοτροφών, διενεργούνται σύμφωνα με κοινοτικούς τρόπους δειγματοληψίας και μεθόδους αναλύσεως·

ότι, για να ελεγχθεί η τήρηση των όρων χρησιμοποιήσεως της αλοφουγινόνης στις ζωοτροφές, πρέπει να καθοριστεί σε κοινοτική κλίμακα μία μέθοδος αναλύσεως για αυτή την προσθετική ουσία·

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

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Τα κράτη μέλη απαιτούν όπως οι αναλύσεις που προβλέπονται για τους επίσημους ελέγχους των ζωοτροφών, όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε αλοφουγινόνη, να πραγματοποιούνται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι αναγκαίες για να συμμορφωθούν προς τις διατάξεις της παρούσας οδηγίας το αργότερο στις 30 Ιουνίου 1994. Ενημερώνουν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

Όταν τα κράτη μέλη εγκρίνουν τις εν λόγω διατάξεις, αυτές περιέχουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από παρόμοια παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Ο τρόπος της παραπομπής αποφασίζεται από τα κράτη μέλη.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 28 Ιουλίου 1993.

Για την Επιτροπή

René STEICHEN

Μέλος της Επιτροπής

---

[1] ΕΕ αριθ. L 170 της 3. 8. 1970, σ. 2.
[2] ΕΕ αριθ. L 362 της 31. 12. 1985, σ. 8.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΛΟΦΟΥΓΙΝΟΝΗΣ

Υδροβρωμική
DL-trans-7-βρωμο-6-χλωρο-3-[3-υδροξυ-2-πιπεριδυλ)-ακετονυλο]-κιναζολινόνη-4-(3H)

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλοφουγινόνης στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 1 mg/kg.

2. **Αρχή της μεθόδου**

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 φάσεως, με τη βοήθεια ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC

3.2. Ρητίνη Amberlite XAD-2

3.3. Οξικό αμμώνιο

3.4. Οξικός αιθυλεστέρας

3.5. Οξικό οξύ

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 °C, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι.

3.6.2. Διαλύματα αναφοράς

Σε σειρά ογκομετρικών φιαλών των 100 ml, μεταφέρονται 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 και 6,0 ml από το μητρικό πρότυπο διάλυμα (σημείο 3.6.1). Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα της κινούμενης φάσης (σημείο 3.21) και ακολουθεί ανάμειξη. Τα διαλύματα αυτά, που πρέπει να παρασκευάζονται πριν από κάθε χρήση, έχουν συγκέντρωση αλοφουγινόνης 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 και 6,0 μg/ml αντίστοιχα.

3.7. Υδροχλωρικό οξύ (ρ_{20} περίπου 1,16 gr/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 HPLC

3.15. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου συγκεντρώσεως gr/100 ml

3.16. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου κορεσμένο σε χλωριούχο νάτριο, συγκεντρώσεως 5 gr/100 ml

Διαλύονται σε νερό 50 gr 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 gr 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 gr νιτρικού αργύρου (σημείο 3.9) σε 10 ml νερού.

3.21. Κινούμενη 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). Το διάλυμα διηθείται με ηθμό των 0,22 μm (σημείο 4.8) και κατόπιν υποβάλλεται σε απαερίωση (παραδείγματος χάρη, με έκθεση σε υπερήχους επί δέκα λεπτά) Το διάλυμα αυτό διατηρείται σταθερό επί ένα μήνα, εφόσον φυλάσσεται στο σκοτάδι σε κλειστό δοχείο.

4. **Εργαστηριακά σκεύη και όργανα**

4.1. Λουτρό υπερήχων

4.2. Περιστρεφόμενος εξατμιστής υμενίου

4.3. Φυγόκεντρος

4.4. Εξοπλισμός HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών

4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με υλικό πληρώσεως C 18 πάχους 10 μm ή ισοδύναμη στήλη

4.5. Γυάλινη στήλη (διαστάσεων 300 mm × 10 mm) εφοδιασμένη με ηθμό από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα

4.6. Ηθμοί από υαλοβάμβακα, διαμέτρου 150 mm

4.7. Διηθητικές μεμβράνες των 0,45 μm

4.8. Διηθητικές μεμβράνες των 0,22 μm

5. **Τρόπος εργασίας**

Σημείωση: Η αλοφουγινόνη ως ελεύθερη βάση είναι ασταθής σε αλκαλικά διαλύματα και διαλύματα οξικού αιθυλεστέρα. Δεν θα 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 αναλυφθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής, το οποίο θα έχει εμπλουτισθεί με ποσότητα αλοφουγινόνης όμοια με αυτή που υπάρχει στο προς ανάλυση δείγμα. Για τον εμπλουτισμό σ' ένα επίπεδο 3mg/Kg προστίθενται 300 μl από το μητρικό πρότυπο διάλυμα (σημείο 3.6.1) σε 10gr τυφλού δείγματος ζωοτροφής και αφού αναμειχθεί αφήνει δέκα λεπτά πριν το επόμενο στάδιο της εκχύλισης (σημείο 5.2).

Σημείωση: Για το σκοπό αυτής της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με το δείγμα και δεν πρέπει να ανιχνευθεί αλοφουγινόνη.

5.2. Εκχύλιση

Σε σωλήνα φυγοκέντρου των 200 ml, ζυγίζονται 10 gr του παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,01 gr και προστίθενται 0,5 gr ασκορβικού νατρίου (σημείο 3.10), 0,5 gr 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) 10gr έτοιμης προς χρήση Amberlite (σημείο 3.9). Στην άνω επιφάνεια της ρητίνης τοποθετείται μικρό βύσμα από υαλοβάμβακα. Η μεθανόλη απορροφάται από τη στήλη και η ρητίνη εκπλύνεται με 100 ml νερού, μέχρι το υγρό να φθάσει στην άνω επιφάνεια της ρυτίνης, 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 εκλούσεως 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 έπλυση της ρητινικής στήλης. Στα τυχόν υπολείματα 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 το χρωματογραφικό προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (σημείο 5.4).

5.4. Ποσοτικός προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC

5.4.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες συνθήκες δίδονται μόνο σαν οδηγός. Άλλες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, υπό την προϋπόθεση να δίδουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Στήλη αναλυτικής χρωματογραφίας (σημείο 4.4.1)

Κινούμενη φάση (σημείο 3.21)

Ταχύτητα ροής: 1,5 έως 2 ml/min

Μήκος κύματος ανιχνευτή: 243 nm

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 40 έως 100 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (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. Καμπύλη αναφοράς

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. Σχεδιάζεται καμπύλη αναφοράς με τεταγμένη τις μέσες τιμές των υψών ή των εμβαδών των κορυφών που λαμβάνονται για διαλύματα αναφοράς και τετμημένη 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. **Έκφραση των αποτελεσμάτων**

Από τις μέσες τιμές των υψών (εμβαδών) των κορυφών που αντιστοιχούν στην αλοφουγινόνη του διαλύματος του δείγματος προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του σε μg/ml με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (σημείο 5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε αλοφουγινόνη w (mg/kg) παρέχεται από τον τύπο:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

όπου:

— c: συγκέντρωση αλοφουγινόνης στο διάλυμα δείγματος σε μg/ml,

— m: μάζα 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. Συγχρωματογράφηση

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 πρέπει να διαφέρει κατά ± 10 % του αρχικού εύρους.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχία διόδων λυχνιών

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι τα ίδια, εντός ορίων που καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα του ανιχνευτή. Για την ανίχνευση σε συστοιχία διόδων λυχνιών, το όριο αυτό είναι συνήθως ± 2 nm·

β) σε μήκος κύματος μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα που αντιστοιχούν στο δείγμα και στο πρότυπο διάλυμα, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για εκείνα τα μέρη του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και σε κανένα σημείο παρατήρησης η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης ελεγχόμενης ουσίας·

γ) σε μήκος κύματος μεταξύ 225 και 300 nm, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα των κορυφών που παράγονται από το εκχύλισμα του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους για εκείνα τα μέρη του φάσματος που περικλείονται μεταξύ 10 % και 100 % της σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν παρατηρούνται οι ίδιες μέγιστες τιμές και όταν σε κανένα σημείο παρατήρησης η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος των κορυφών.

Εάν ένα από τα κριτήρια αυτά δεν πληρούται, η παρουσία της ελεγχόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωμένη.

7.2. Επαναληπτικότητα

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων ποσοτικών προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 mg/Kg, προκειμένου για περιεκτικότητα σε αλοφουγινόνη 3mg/Kg.

7.3. Ανάκτηση

Για το εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, ο βαθμός ανάκτησης πρέπει να είναι τουλάχιστον 80 %.

8. **Αποτελέσματα συλλογικής μελέτης**

Οργανώθηκε συλλογική μελέτη (1), κατά την οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση τρία δείγματα σε οκτώ εργαστήρια.

Αποτελέσματα

	Δείγμα Α (τυφλό) κατά την παραλαβή	Δείγμα Β (σιτηρέσιο)		Δείγμα Γ (μορφοποιημένο σε σφαιρίδια)	
		Κατά την παραλαβή	Μετά δύο μήνες	Κατά την παραλαβή	Μετά δύο μήνες
Μέση τιμή (1)	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
ανκ		86	74	88	75

(1): σε mg/kg.
n.d.: δεν ανιχνεύθηκε.
S_R: τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας.
CV_R: συντελεστής διακυμάνσεως (%).
ανκ: ανάκτηση (%).

(1) The Analyst 1983, 108: 1252-1256.