ΟΔΗΓΙΑ 98/64/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 3ης Σεπτεμβρίου 1998

για τον καθορισμό κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, των ακατέργαστων λιπαρών ουσιών και του olaquindox στις ζωοτροφές και για την τροποποίηση της οδηγίας 71/393/ΕΟΚ της Επιτροπής

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής 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 την πράξη προσχώρησης της Αυστρίας, της Φινλανδίας και της Σουηδίας, και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι, η οδηγία 70/373/ΕΟΚ προβλέπει ότι ο επίσημος έλεγχος των ζωοτροφών προκειμένου να διαπιστώνεται κατά πόσο πληρούνται οι νομοθετικές, κανονιστικές ή διοικητικές διατάξεις όσον αφορά την ποιότητα και τη σύνθεση αυτών, πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις κοινοτικές μεθόδους δειγματοληψίας και ανάλυσης·

ότι, η οδηγία 79/373/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 2ας Απριλίου 1979, περί εμπορίας των σύνθετων ζωοτροφών [2], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 97/47/ΕΚ της Επιτροπής [3] και η οδηγία 93/74/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 13ης Σεπτεμβρίου 1993, για τις ζωοτροφές με τις οποίες επιδιώκονται στόχοι ιδιαίτερης διατροφής [4], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 96/25/ΕΚ [5] προβλέπουν τη δήλωση των αμινοξέων και των ακατέργαστων λιπαρών ουσιών στην επισήμανση των ζωοτροφών·

ότι, εξάλλου, η οδηγία 70/524/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 23ης Νοεμβρίου 1970, περί των προσθέτων υλών στις ζωοτροφές [6] όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 98/19/ΕΚ της Επιτροπής [7] προβλέπει ότι η περιεκτικότητα σε olaquindox πρέπει να αναφέρεται στην επισήμανση, εφόσον η ουσία αυτή προστίθεται στις σύνθετες ζωοτροφές·

ότι η δεύτερη οδηγία 71/393/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 18ης Νοεμβρίου 1971, περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών [8], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 84/4/ΕΟΚ [9], θεσπίζει μεθόδους ανάλυσης, μεταξύ άλλων για τον προσδιορισμό των ακατέργαστων λιπαρών ουσιών· ότι είναι σκόπιμο να τροποποιηθεί η αναφερθείσα μέθοδος·

ότι πρέπει να καθοριστούν οι κοινοτικοί μέθοδοι ανάλυσης για τον έλεγχο των εν λόγω ουσιών·

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 ορίζουν ότι οι αναλύσεις που προβλέπονται για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών, όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα, ακατέργαστες λιπαρές ουσίες και σε olaquindox πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Στο παράρτημα της οδηγίας 71/393/ΕΟΚ της Επιτροπής, το σημείο «4. Προσδιορισμός των ακατέργαστων λιπαρών ουσιών» αντικαθίσταται από το μέρος Β του παραρτήματος της παρούσας οδηγίας.

Άρθρο 3

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις τις αναγκαίες για τη συμμόρφωση με την παρούσα οδηγία έως τις 31 Δεκεμβρίου 1998. Τα κράτη μέλη ενημερώνουν αμέσως σχετικά την Επιτροπή.

Εφαρμόζουν τις εν λόγω διατάξεις από την 1η Ιανουαρίου 1999.

Οι εν λόγω διατάξεις, κατά τη θέσπισή τους από τα κράτη μέλη, περιλαμβάνουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από ανάλογη παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομέρειες σχετικά με την εν λόγω παραπομπή καθορίζονται από τα κράτη μέλη.

[1] ΕΕ L 170 της 3. 8. 1970, σ. 2.
[2] ΕΕ L 86 της 6. 4. 1979, σ. 30.
[3] ΕΕ L 211 της 5. 8. 1997, σ. 45.
[4] ΕΕ L 237 της 22. 9. 1993, σ. 23.
[5] ΕΕ L 125 της 23. 5. 1996, σ. 35.
[6] ΕΕ L 270 της 14. 12. 1970, σ. 1.
[7] ΕΕ L 96 της 28. 3. 1998, σ. 39.
[8] ΕΕ L 279 της 20. 12. 1971, σ. 7.
[9] ΕΕ L 15 της 18. 1. 1984, σ. 28.

2. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή το κείμενο των σημαντικότερων διατάξεων εσωτερικού δικαίου που θεσπίζουν στον τομέα που καλύπτεται από την παρούσα οδηγία.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 5

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 3 Σεπτεμβρίου 1998.

Για την Επιτροπή
Franz FISCHLER
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΤΜΗΜΑ Α

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος αναφέρεται στον προσδιορισμό των ελεύθερων (συνθετικών και φυσικών) και ολικών (ενωμένων σε πεπτίδια και ελευθέρων) αμινοξέων στις ζωοτροφές με 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 αλάτων των αμινοξέων ούτε και μπορεί να επιτύχει διαφοροποίηση μεταξύ των μορφών D και L των αμινοξέων. Δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της τρυπτοφάνης και 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 δι' αντιδράσεως με νινυδρίνη και φωτομετρική ανίχνευση στα 570 nm.

2.2. *Ολικά αμινοξέα*

Ο τρόπος εργασίας εξαρτάται από τα εξεταζόμενα αμινοξέα. Η κυστ(ε)ίνη και η μεθειονίνη πρέπει να οξειδώνονται προς κυστεϊνικό οξύ και 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 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 (c = 6 mol/l) επί 23 ώρες. Το pH του υδρολύματος ρυθμίζεται στο 2,20. Τα αμινοξέα διαχωρίζονται με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και προσδιορίζονται δι' αντιδράσεως με νινυδρίνη και φωτομετρική ανίχνευση στα 570 nm (440 nm στην περίπτωση της προλίνης).

3. **Αντιδραστήρια**

Χρησιμοποιείται δισαπεσταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης καθαριότητας (αγωγιμότητα < 10 μS).

3.1. Υπεροξείδιο του υδρογόνου, W = 30 %.

3.2. Μυρμηκικό οξύ, W = 98-100 %.

3.3. Φαινόλη.

3.4. Διθειώδες νάτριο.

3.5. Υδροξείδιο του νατρίου.

3.6. Δισένυδρο 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ.

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

3.8. Δισένυδρο ουδέτερο κιτρικό νάτριο.

3.9. 2,2′-Θειοδιαιθανόλη (θειοδιγλυκόλη).

3.10. Χλωριούχο νάτριο.

3.11. Νινυδρίνη.

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

3.13. Νορλευκίνη ή άλλες ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα.

3.14. Αέριο άζωτο (< 10 ppm οξυγόνο).

3.15. 1-Οκτανόλη

3.16. Αμινοξέα

3.16.1. Πρότυπες ουσίες από τις αναφερόμενες στην παράγραφο 1. Καθαρές ενώσεις που δεν περιέχουν κρυσταλλικό νερό. Πριν χρησιμοποιηθούν, ξηραίνονται υπό κενό υπεράνω P_2O_5 και H_2SO_4 για μία εβδομάδα.

3.16.2. Κυστεϊνικό οξύ.

3.16.3. Σουλφόνη μεθειονίνης.

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

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

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

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

3.19. Διάλυμα μυρμηκικού οξέος-φαινόλης:

889 g μυρμηκικού οξέος (3.2) αναμειγνύονται 111 g νερό και προστίθενται 4,73 g φαινόλης (3.3).

3.20. Μείγμα υδρολύσεως, c = 6 mol HCl/l με 1 g φαινόλης/l:

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

3.21. Μείγμα εκχυλίσεως, c = 0,1 mol HCl/l με 2 % θειοδιγλυκόλη:

Λαμβάνονται 8,2 ml HCl (3.7), αναμειγνύονται με 900 ml περίπου νερό, προστίθενται 20 ml θειοδιγλυκόλη (3.9) και το μείγμα συμπληρώνεται με νερό μέχρις 1 λίτρου (τα 3.7 και 3.9 να μην αναμειγνύονται απ' ευθείας).

3.22. 5-Σουλφοσαλικυλικό οξύ, β = 6 %:

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

3.23. Μείγμα οξειδώσεως (υπερμυρμηκικό οξύ-φαινόλη):

0,5 ml υπεροξειδίου του υδρογόνου (3.1) αναμειγνύονται με 4,5 ml διαλύματος φαινόλης και μυρμηκικού οξέος (3.19) μέσα σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 20 έως 30 °C επί μία ώρα για να ληφθεί υπερμυρμηκικό οξύ, κατόπιν δε ψύχεται σε παγόλουτρο (15 min) πριν να προστεθεί στο δείγμα.

Προσοχή: Να αποφεύγεται η επαφή με το δέρμα και να χρησιμοποιούνται προστατευτικά ενδύματα.

3.24. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

19,61 g κιτρικού νατρίου (3.8), 5 ml θειοδιγλυκόλης (3.9), 1 g φαινόλης (3.3) και 16,50 ml HCl (3.7) διαλύονται σε 800 ml νερό περίπου. Το pH ρυθμίζεται στο 2,20. Συμπληρώνεται με νερό μέχρι το 1 λίτρο.

3.25. Ρυθμιστικά διαλύματα εκλούσεως που παρασκευάζονται όπως προβλέπεται για τον χρησιμοποιούμενο αναλυτή (4.9).

3.26. Αντιδραστήριο νινυδρίνης, παρασκευαζόμενο όπως προβλέπεται για τον χρησιμοποιούμενο αναλυτή (4.9).

3.27. Πρότυπα διαλύματα αμινοξέων. Τα διαλύματα αυτά διατηρούνται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C.

3.27.1. Πρότυπο διάλυμα αμινοξέων (3.16.1). c = 2,5 μmol/l καθενός σε υδροχλωρικό οξύ. Μπορεί να ληφθεί από το εμπόριο.

3.27.2. Διάλυμα αναφοράς κυστεϊνικού οξέος και σουλφόνης μεθειονίνης. c = 1,25 μmol/ml.

0,2115 g κυστεϊνικού οξέος (3.16.2) και 0,2265 g σουλφόνης μεθειονίνης (3.16.3) διαλύονται στο ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24) μέσα σε ογκομετρική φιάλη του 1 λίτρου και συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24). Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C. επί 12 μήνες κατ' ανώτατο όριο. Το διάλυμα αυτό δεν χρησιμοποιείται εάν το πρότυπο διάλυμα (3.27.1) περιέχει κυστεϊνικό οξύ και σουλφόνη μεθειονίνης.

3.27.3. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου, π.χ. νορλευκίνη. c = 20 μmol/l.

0,6560 g νορλευκίνης (3.13) διαλύονται στο ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24) και το διάλυμα συμπληρώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα (3.24) μέχρι τα 250 ml. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C επί 6 μήνες κατ' ανώτατο όριο.

3.27.4. Διάλυμα διακριβώσεως αμινοξέων για χρήση με τα υδρολύματα c = 5 nmol/50 μl κυστεϊνικού οξέος και σουλφόνης μεθειονίνης και c = 10 nmol/50 μl για τα άλλα αμινοξέα:

Διαλύονται 2,2 g χλωριούχου νατρίου (3.10) μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml με 30 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24). Προστίθενται 4,00 ml προτύπου διαλύματος αμινοξέων (3.27.1), 4,00 ml προτύπου διαλύματος κυστεϊνικού οξέος και σουλφόνης μεθειονίνης (3.27.2) και 0,50 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (3.27.3) αν χρειάζεται. Η τιμή του pH ρυθμίζεται στο 2,20 με υδροξείδιο του νατρίου (3.18).

Όλο το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24) και αναμιγνύεται.

Διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C επί 3 μήνες κατ' ανώτατο όριο.

Βλέπε επίσης παρατηρήσεις 9.1.

3.27.5. Διάλυμα διακριβώσεως αμινοξέων για χρήση με τα υδρολύματα που παρασκευάζονται σύμφωνα με την παράγραφο 5.3.3.1. και που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν με εκχυλίσματα (5.2). Το διάλυμα διακριβώσεως παρασκευάζεται σύμφωνα με τα αναφερόμενα στο 3.27.4 αλλά χωρίς χλωριούχο νάτριο.

Διατηρείται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C επί τρεις μήνες κατ' ανώτατο όριο.

4. **Εξοπλισμός**

4.1. Σφαιρική φιάλη των 100 ή 250 ml, εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα.

4.2. Φιάλη από βιριοπυριτικό γυαλί των 100 ml με βιδωτό πώμα με επένδυση από καουστούκ/τεφλόν (π.χ. Duran, Schott) για χρήση σε κλίβανο ± 2 °C.

4.3. Φούρνος με εξηναγκασμένο αερισμό και ρύθμιση της θερμοκρασίας με ακρίβεια μεγαλύτερη από ± 2 °C.

4.4. Πεχάμετρο (με ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων).

4.5. Διηθητική μεμβράνη (με πόρους διαμέτρου 0,2 μm).

4.6. Φυγόκεντρος.

4.7. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.

4.8. Μηχανικός ή μαγνητικός αναδευτήρας.

4.9. Αυτόματος αναλυτής αμινοξέων ή εξοπλισμός HPLC (υγρή χρωματουργία υψηλής απόδοσης) εφοδιασμένος με ιονανταλλακτική ρητίνη, διάταξη για την αντίδραση νινυδρίνης μετά τη διέλευση από τη στήλη και φωτομετρικό ανιχνευτή.

Η στήλη πληρούται με σουλφονωμένες ρητίνες πολυστυρολίου για το διαχωρισμό των διαφόρων αμινοξέων μεταξύ τους και από τις άλλες ύλες ικανές που αντιδρούν με νινυδρίνη. Η ροή του ρυθμιστικού διαλύματος και της νινυδρίνης επιτυγχάνεται με αντλίες με σταθερότητα ροής ± 0,5 % κατά το χρονικό διάστημα αναλύσεως τόσον του διαλύματος διακριβώσεως όσο και του δείγματος.

Με ορισμένους αναλυτές αμινοξέων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι υδρολύσεως στις οποίες το υδρόλυμα έχει συγκέντρωση νατρίου c = 0,8 mol/l και περιέχει όλο το εναπομένον μυρμηκικό οξύ που προέρχεται από την οξείδωση. Με άλλες συσκευές δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός ορισμένων αμινοξέων εάν το διάλυμα περιέχει πολύ μυρμηκικό οξύ ή/και εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος του οξέος ελαττώνεται με εξάτμιση στα 5 ml περίπου μετά την υδρόλυση και πριν από τη ρύθμιση του pH. Η εξάτμιση πρέπει να πραγματοποιείται υπό κενό στους 40 °C κατ' ανώτατο όριο.

5. **Τρόπος εργασίας**

5.1. *Προετοιμασία του δείγματος*

Το δείγμα λειοτριβείται ώστε να αποκτήσει κοκκομετρική σύσταση της τάξεως των 0,5 mm. Τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία πρέπει να ξηραίνονται με αέρα σε θερμοκρασία 50 °C κατ' ανώτατο όριο ή με λυοφιλίωση πριν από τη λειοτρίβηση. Τα δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά πρέπει να εκχυλίζονται με πετρελαϊκό αιθέρα (3.12) πριν από τη λειοτρίβηση.

5.2. Προσδιορισμός των ελεύθερων αμινοξέων σε ζωοτροφές και προσμείγματα

Κατάλληλη ποσότητα (1-5 g) του προετοιμασθέντος δείγματος (5.1) ζυγίζεται με ακρίβεια 0,2 mg σε φιάλη Erlenmeyer και προστίθενται 100 ml του μείγματος εκχυλίσεως (3.21). Το μείγμα αναδεύεται επί 60 min με μηχανικό ή μαγνητικό αναδευτήρα (4.8). Αφήνεται να κατακαθίσει το ίζημα και με ένα σιφώνιο λαμβάνονται 10,0 ml από το υπερκείμενο διάλυμα και φέρονται σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml.

Προστίθενται με ανάδευση 5,0 ml διαλύματος σουλφοσαλικυλικού οξέος (3.22) και η ανάδευση συνεχίζεται επί 5 min με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η υπερκείμενη φάση διηθείται ή φυγοκεντρείται για να διαχωριστεί τυχόν ίζημα 10,0 ml του προκύπτοντος διαλύματος μεταγγίζονται σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml, ρυθμίζεται το pH στο 2,20 με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18), μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη κατάλληλου όγκου με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών (3.24) και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα (3.24).

Εάν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, προστίθενται 1,00 ml εσωτερικού προτύπου (3.27.3) ανά 100 ml του τελικού διαλύματος και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος (3.24).

Ακολουθεί το στάδιο της χρωματογραφίας σύμφωνα με το σημείο 5.4.

Εάν τα εκχυλίσματα δεν χρωματογραφηθούν την ίδια ημέρα, αυτά πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μικρότερη από 5 °C.

5.3. *Προσδιορισμός των ολικών αμινοξέων*

5.3.1. Οξείδωση

Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,2 mg, από 0,1 g έως 1 g του προετοιμασθέντος δείγματος (5.1) μέσα:

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

— σε σφαιρική φιάλη των 250 ml (4.1) για ανοικτή υδρόλυση (5.3.3.1), εάν απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση νατρίου ή

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

Το οποίο θα πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε άζωτο περίπου 10 mg και υγρασία 100 mg το πολύ.

Η οποία φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και ψύχεται στους 0 °C. Προστίθενται 5 ml του προς οξείδωση μείγματος (3.23) και ανακατεύεται με τη βοήθεια γυάλινης σπάτουλας με κεκαμμένο άκρο. Η φιάλη με τη σπάτουλα κλείνεται ερμητικά με τη βοήθεια αεροστεγούς μεμβράνης (φιλμ), το παγόλουτρο με τον σφραγισμένο περιέκτη τοποθετείται σε ψυγείο στους 0 °C και αφήνεται να παραμείνει εκεί επί 16 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνεται από το ψυγείο και η περίσσεια του οξειδωτικού αντιδραστηρίου αποσυντίθεται με προσθήκη 0,84 g δοθειώδους νατρίου (3.4).

Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 5.3.2.1.

5.3.2. Υδρόλυση

5.3.2.1. Υδρόλυση οξειδωμένων δειγμάτων:

Στο παρασκευασθέν σύμφωνα με το 5.3.1 οξειδωμένο δείγμα, προστίθενται 25 ml του μείγματος υδρολύσεως (3.20) φροντίζοντας να απομακρυνθεί με έκπλυση κάθε υπόλειμμα του δείγματος που τυχόν έχει κολλήσει στις παρειές του περιέκτη και στη σπάτουλα. Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο υδρολύσεως, εφαρμόζεται η μέθοδος του σημείου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

5.3.2.2. Υδρόλυση των μη οξειδωμένων δειγμάτων:

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml ή 250 ml (4.1) ή σε φιάλη των 100 ml με βιδωτό πώμα (4.2), ζυγίζονται με ακρίβεια 0,2 mg, 0,1 έως 1 g του προετοιμασθέντος δείγματος (5.1). Η ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος θα πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε άζωτο περίπου 10 mg. Προστίθενται με προσοχή 25 ml του προς υδρόλυση μείγματος (3.20) και ανακατεύεται με το δείγμα. Ακολουθεί η διαδικασία του σημείου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4.

5.3.2.3. Ανοικτή υδρόλυση (με κάθετο ψυκτήρα):

Στο μείγμα της φιάλης (που παρασκευάστηκε σύμφωνα με το σημείο 5.3.2.1 ή 5.3.2.2) προστίθενται 3 γυάλινα σφαιρίδια και αφήνεται να βράζει συνεχώς επί 23 ώρες ακριβώς. Μετά την υδρόλυση, ο ψυκτήρας ξεπλένεται με 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών (3.24). Η φιάλη αποσυνδέεται και αφήνεται να ψυχθεί σε παγόλουτρο. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 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 φούρνο (4.3) ρυθμισμένο στους 110 °C.Την πρώτη ώρα, για να προληφθεί τυχόν ανύψωση της πιέσεως λόγω της έκλυσης αέριων ουσιών και τυχόν έκρηξη, το βιδωτό πώμα τοποθετείται απλώς πάνω στον περιέκτη *χωρίς να βιδωθεί.* Μετά 1 ώρα, το πώμα βιδώνεται και η φιάλη αφήνεται στον κλίβανο (4.3) επί 23 ώρες. Μετά την συμπλήρωση της υδρόλυσης, η φιάλη απομακρύνεται από τον κλίβανο, ξεβιδώνεται, με προσοχή το πώμα και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Αφήνεται να ψυχθεί.

Ανάλογα με τη διαδικασία ρύθμισης του pH (5.3.3) το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται ποσοτικά σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml, χρησιμοποιώντας γι' αυτό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24).

Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφεται στο 5.3.3.

5.3.3. Ρύθμιση του pH

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

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

Εάν χρησιμοποιούνται αναλύτες αμινοξέων που απαιτούν χαμηλή συγκέντρωση νατρίου (όταν πρέπει να μειωθεί ο όγκος του οξέος), συνιστάται να χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο (3.27.3).

Στην περίπτωση αυτή, προστίθενται στο υδρόλυμα 2,00 ml του διαλύματος του εσωτερικού προτύπου (3.27.3) πριν ή μετά την εξάτμιση.

Στο υδρόλυμα που λαμβάνεται σύμφωνα με τη διαδικασία του σημείου 5.3.2.3 ή 5.3.2.4, προστίθενται 2 σταγόνες 1-οκτανόλης (3.15).

Με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (4.7) ο όγκος μειώνεται υπό κενό και στους 40 °C στα 5 έως 10 ml. Εάν τυχόν ο όγκος μειωθεί σε λιγότερο από 5 ml, το υδρόλυμα πρέπει να απορρίπτεται και η ανάλυση να ξαναρχίζει.

Ρυθμίζεται το pH στο 2,20 με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18) και η εργασία συνεχίζεται σύμφωνα με τη διαδικασία του σημείου 5.3.4.

5.3.3.2. Για όλους τους υπόλοιπους αναλύτες αμινοξέων (4.9):

Τα υδρολύματα που λαμβάνονται σύμφωνα με το σημείο 5.3.2.3 ή 5.3.2.4 συλλέγονται και εξουδετερώνονται μερικώς προσθέτοντας προσεκτικά και υπό ταυτόχρονη ανάδευση, 17 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (3.17), προσέχοντας ταυτόχρονα να διατηρείται η θερμοκρασία κάτω των 40 °C.

Ρυθμίζεται το pH στο 2,20 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.17) και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (3.18). Ακολουθεί η διαδικασία του σημείου 5.3.4.

5.3.4. Διάλυμα δείγματος για χρωματογραφία

Το ρυθμισμένο ως προς το pH (5.3.3.1 ή 5.3.3.2) υδρόλυμα μεταφέρεται ποσοτικά με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24) σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα (3.24).

Εάν δεν έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί εσωτερικό πρότυπο, προστίθενται 2,00 ml (3.27.3) και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα (3.24). Αναμειγνύεται επισταμένως.

Ακολουθεί στο στάδιο της χρωματογραφίας (5.4).

Εάν τα δείγματα δεν χρωματογραφηθούν την ίδια ημέρα, διατηρούνται σε θερμοκρασία κάτω από 5 °C.

5.4. *Χρωματογραφία*

Πριν από τη χρωματογραφία, το εκχύλισμα (5.2) ή το υδρόλυμα (5.3.4) φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αναδεύεται και κατάλληλη ποσότητα διηθείται διαμένου διηθητικής μεμβράνης 0,2 μm (4.5). Το λαμβανόμενο διαυγές διάλυμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με αναλυτή αμινοξέων (4.9).

Η έγχυση πρέπει να γίνεται με το χέρι ή αυτομάτως. Στη στήλη για την ανάλυση των διαλυμάτων αναφοράς ή των δειγμάτων πρέπει να προστίθεται πάντοτε η ίδια ποσότητα διαλύματος (± 0,5 %), εκτός κι αν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, ενώ οι λόγοι νατρίου/αμινοξύ στα διαλύματα αναφοράς και στα δείγματα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν παρόμοια.

Η συχνότητα των εγχύσεων των προτύπως διαλυμάτων εξαρτάται από τη σταθερότητα της νινυδρίνης και το σύστημα αναλύσεως εν γένει. Το πρότυπο διάλυμα ή το δείγμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (3.24) ώστε να επιτυγχάνεται εμβαδόν κορυφής προτύπου ίσο με το 30 έως 200 % του εμβαδού της κορυφής του αμινοξέος στο δείγμα.

Η χρωματογραφία των αμινοξέων ποικίλλει ελαφρά ανάλογα με τον τύπο ττου χρησιμοποιούμενου αναλυτή και τη ρητίνη. Το επιλεγόμενο σύστημα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει τα αμινοξέα μεταξύ τους και από τις ουσίες που αντιδρούν με νινυδρίνη. Κατά τη διάρκεια της εργασίας, το χρωματογραφικό σύστημα θα πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση σε μεταβολές των ποσοτήτων των αμινοξέων που προστίθενται στην στήλη.

Στη χρωματογραφία, και όταν αναλύεται ισομοριακό διάλυμα των προσδιοριζομένων αμινοξέων εφαρμόζονται οι λόγοι ύψους κοίλων/κορυφές που αναφέρονται παρακάτω. Το ισομοριακό αυτό διάλυμα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 30 % της μέγιστης ποσότητας κάθε αμινοξέος που μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια με τη συσκευή ανάλυσης των αμινοξέων (4.9).

Για το διαχωρισμό θρεονίνης-σερίνης, ο λόγος υψών κοίλου/κορυφής του χαμηλότερου από τα δύο αλληλεπικαλυπτόμενα αμινοξέα στο χρωματογράφημα, δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 2:10. (Εάν ο προσδιορισμός αφορά μόνο την κυστ(ε)ίνη, τη μεθειονίνη, τη θρεονίνη και τη λυσίνη, τυχόν ανεπαρκής διαχωρισμός των γειτονικών κορυφών θα έχει δυσμενές αποτέλεσμα στον προσδιορισμό). Για όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα, ο διαχωρισμός πρέπει να είναι καλύτερος από 1:10.

Το σύστημα πρέπει να διασφαλίζει τον διαχωρισμό της λυσίνης από «ψευδοκορυφές λυσίνης» και την ορνιθίνη.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Μετριέται για κάθε συγκεκριμένο αμινοξύ το εμβαδόν των κορυφών του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς και η ποσότητα, εκφρασμένη σε γραμμάρια αμινοξέος ανά kg δείγματος, υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{A \times E \times MB \times F}{B \times W \times 1\,000} = g \text{ αμινοξέος ανά kg δείγματος}$$

Εάν χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο, πολλαπλασιάζουμε 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

MB = μοριακό βάρος

E = συγκρέντρωση προτύπου σε μmol/ml

W = βάρος δείγματος (g) (διορθούμενο στο αρχικό βάρος εάν το προϊόν έχει ξηρανθεί ή απολιπανθεί)

F = ml συνολικού υδρολύματος (5.3.4) ή ml υπολογιζόμενου όγκου του συνολικού αραιωμένου εκχυλίσματος (6.1).

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

Η μεθειονίνη προσδιορίζεται ως σουλφόνη μεθειονίνης σε υδρολύματα οξειδωμένου δείγματος, υπολογίζεται όμως ως μεθειονίνη χρησιμοποιώντας την τιμή MB = 149,21 για τη μεθειονίνη.

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

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

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

V = όγκος του τελικού εκχυλίσματος.

7. **Αξιολόγηση της μεθόδου**

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

Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις σε g/kg

Ουσία αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Μείγμα ζωοτροφών για χοίρους	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Σύνθετη ζωοτροφή για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Πρόμειγμα	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων

7.1. *Επαναληψιμότητα*

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

Τυπική απόκλιση εντός εργαστηρίου (S_r) σε g/kg

Ουσία αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Μείγμα ζωοτροφών για χοίρους	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Σύνθετη ζωοτροφή για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Πρόμειγμα	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων

Συντελεστής διακύμανσης (%) τυπικής απόκλισης μεταξύ εργαστηρίων (S_r)

Ουσία αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Μείγμα ζωοτροφών για χοίρους	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Σύνθετη ζωοτροφή για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών	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 την διεργαστηριακή σύγκριση που αναφέρθηκε παραπάνω, εμφαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Τυπική απόκλιση μεταξύ εργαστηρίων (S_R) σε g/kg

Ουσία αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Μείγμα ζωοτροφών για χοίρους	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Σύνθετη ζωοτροφή για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Πρόμειγμα	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = αριθμός συμμετασχόντων εργαστηρίων

Συντελεστής διακύμανσης (%) της τυπικής απόκλισης μεταξύ εργαστηρίων (S_R)

Ουσία αναφοράς	Αμινοξύ			
	Θρεονίνη	Κυστ(ε)ίνη	Μεθειονίνη	Λυσίνη
Μείγμα ζωοτροφών για χοίρους	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Σύνθετη ζωοτροφή για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Συμπύκνωμα πρωτεϊνών	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 διαθέσιμοι. 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 (βλέπει σημείο 5.3.4).

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

Η πρότυπη διάλυση διαλύεται με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού άλατος προκειμένου να παρουσιασθούν οι περιοχές αιχμής στο μέσο του πεδίου.

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

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

ΤΜΗΜΑ Β

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΩΝ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η παρούσα μέθοδος αποσκοπεί στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ακατέργαστα έλαια και λίπη των ζωοτροφών. Δεν καλύπτει την ανάλυση των ελαιούχων σπόρων και καρπών που καθορίζονται από τον κανονισμό του Συμβουλίου αριθ. 136/66/ΕΟΚ της 22ας Σεπτεμβρίου 1966.

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

1.1. *Διαδικασία Α — Μέσες εκχυλιζόμενες ακατέργαστες λιπαρές ουσίες*

Εφαρμόζεται σε απλά υλικά φυτικής προελεύσεως, εξαιρέσει εκείνων που εντάσσονται στο πεδίο εφαρμογής της διαδικασίας Β.

1.2. *Διαδικασία Β — Ολικά ακατέργαστα έλαια και λίπη*

Εφαρμόζεται σε απλά υλικά ζωικής προελεύσεως, 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. γλυτένες, 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 ή επιτυγχανόμενη διά της διαδικασίας Β.

2. **Αρχή**

2.1. *Διαδικασία Α*

Το δείγμα υδρολύεται δι' αιθέρος. Το διαλυτικό μέσο απομακρύνεται με απόσταξη και το υπόλειμμα ξηραίνεται και ζυγίζεται.

2.2. *Διαδικασία Β*

Το δείγμα επεξεργάζεται 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. 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 3Μ.

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

4. **Συσκευές**

4.1. Συσκευή εκχυλίσεως. 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 εκχυλίσεως, ελεύθερα ουσιών διαλυτών στον αιθέρα, 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 εκχυλίσεως (4.2) και καλύπτονται διά πώματος εκ βάμβακος απαλλαγμένου λιπαρών ουσιών.

Τοποθετείται το φυσίγγιο εντός συσκευής εκχυλίσως (4.1) και εκχυλίζεται επί 6 ώρες με αιθέρα (3.1). Συλλέγεται το εκχύλισμα εντός ξηράς φιάλης [1], εφοδιασμένης μετά μερικών τεμαχίων κισσήρεως, της οποίας έχει ληφθεί το απόβαρο.

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

5.2. *Διαδικασία Β*

Ζυγίζονται 2,5 g δείγματος με προσέγγιση 1 ml (βλέπε παρατήρηση 8.2) και εισάγονται εντός γυαλίνου ποτηρίου ζέσεως των 400 ml ή εντός κωνικής φιάλης των 300 ml και προστίθενται 100 ml υδροχλωρικού οξέος 3Μ (3.3) και μερικά τεμάχια κισσήρεως. Καλύπτεται το υάλινο ποτήριο ζέσεως με ύαλο ωρολογίου ή εφοδιάζεται η κωνική φιάλη μετά καθέτου ψυκτήρος. Φέρεται το μείγμα 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 υποδοχέως.

Ψύχεται και προστίθεται ποσότητα επιβοηθητικού διηθήσεως (3.4), επαρκής προς αποφυγή κάθε απωλείας λιπαρής ύλης κατά τη διάρκεια της διηθήσεως. Διηθείται διά διπλού υγρανθέντος διηθητικού χάρτου ελεύθερου λιπαρών υλών. Εκπλύνεται το υπόλειμμα με ψυχρό ύδωρ μέχρις ουδετεροποιήσεως του διηθήματος. Η παρουσία αυτών διεκνύει ότι το δείγμα πρέπει να εκχυλιστεί δι' αιθέρος, κατά τη διαδικασία Α, προ της υδρολύσεως.

Τοποθετείται ο διπλός διηθητικός χάρτης ο οποίος περιέχει το υπόλειμμα επί υάλου ωρολογίου και ξηραίνεται επί μία και ημίσεια ώρα εντός κλιβάνου αποξηράνσεων σε θερμοκρασία 100 °C ± 3 °C.

Εισάγεται ο διπλός διηθητικός χάρτης και το ξηρό υπόλειμμα εντός φυσιγγίου εκχυλίσεως (4.2) και καλύπτεται διά πώματος εκ βάμβακος απαλλαγμένου λιπαρών ουσιών (4.1). Τοποθετείται το φυσίγγιον εντός συσκευής εκχυλίσεως και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.1, δεύτερη και τρίτη παράγραφος.

[1] Όταν η λιπαρά ύλη πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο μεταγενέστερων ποιοτικών εξετάσεων, τα τεμάχια κισσήρεως αντικαθίστανται από γυάλινες χάντρες.

6. **Διατύπωση των αποτελεσμάτων**

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

7. **Επαναληπτικότητα**

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παραλλήλων προσδιορισμών, διενεργουμένων επί του αυτού δείγματος, από τον ίδιο αναλυτή, δεν πρέπει να υπερβαίνει:

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

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

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

8. **Παρατηρήσεις**

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

Ζυγίζονται 20 g δείγματος με προσέγγιση 1 mg και αναμειγνύονται μετά ποσότητος 10 g ή περισσοτέρων ανύδρου θειικού νατρίου (3.2). Διενεργείται εκχύλιση δι' αιθέρος (3.1) όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.1. Συμπληρούται το επιτευχθέν εκχύλισμα έως 500 ml δι' αιθέρος (3.1) και αναμιγνύεται. Εισάγονται 50 ml του διαλύματος σε μικρή ξηρή φιάλη εφοδιασμένη με μερικά τεμάχια κισσήρεως της οποίας έχει ληφθεί το απόβαρο [1]. Απομακρύνεται το διαλυτικό μέσο δι' αποστάξεως, ξηραίνεται και ακολουθείται ο τρόπος εργασίας όπως υποδεικνύεται στο σημείο 5.1 τελευταία παράγραφος.

Απομακρύνεται το διαλυτικό μέσο του υπολείμματος της εκχυλίσεως, το οποίο ευρίσκεται 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 τελευταία παράγραφος.

Η περιεκτικότης σε ακατέργαστες λιπαρές ύλες επί τοις εκατό του δείγματος εκφράζεται κατά τον τύπο:

$(10\ a + b) \times 5$

όπου:

a = μάζα σε γραμμάρια του υπολείμματος της πρώτης εκχυλίσεως (χρησιμοποιηθέν μέρος του εκχυλίσματος),

b = μάζα σε γραμμάρια του υπολείμματος του δευτέρου εκχυλίσματος.

8.2. Η ποσότητα του δείγματος των χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρές ύλες προϊόντων δύναται να ανέρχεται σε 5 g.

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

8.4. Στην παράγραφο 5.2, ενδέχεται να είναι αποτελεσματικότερη η χρήση θερμού ύδατος, 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. Δύναται επίσης να χρησιμοποιηθεί φούρνος μικροκυμάτων.

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

ΤΜΗΜΑ Γ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ OLAQUINDOX

(2-[N-2′-(υδροξυαιθυλο)καρβαμοϋλο]-3μεθυλοκινοξαλίνης-N^1,N^4-διοξείδιο)

1. **Σκοπός και πεδίο εφαρμογής**

Αντικείμενο της παρούσας μεθόδου είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του olaquindox στις ζωοτροφές. Το κατώτερο όριο προσδιορισμού είναι 5mg/kg.

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα νερού-μεθανόλης. Η περιεκτικότητα σε olaquindox προσδιορίζεται με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) ανάστροφης φάσεως χρησιμοποιώντας ανιχνευτή UV.

[1] Όταν η λιπαρά ύλη πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο μεταγενέστερων ποιοτικών εξετάσεων, τα τεμάχια κισσήρεως αντικαθίστανται από γυάλινες χάντρες.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Μεθανόλη

3.2. Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC

3.3. Νερό, καθαρότητας HPLC

3.4. Κινητή φάση για HPLC

Μείγμα νερού (3.3)-μεθανόλης (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Πρότυπη ουσία: καθαρό olaquindox pur [2-/(N-2′-(υδροξυαίθυλο)καρβαμοϋλο] -3-μεθυλοκινοξαλίνης -N^1,N^4-διοξίδιο], E 851.

3.5.1. Αρχικό πρότυπο διάλυμα 250 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1mg, 50 mg olaquindox (3.5) και προστίθενται 190 ml περίπου νερό. Κατόπιν, η φιάλη τοποθετείται για 20 min σε λουτρό υπερήχων (4.1). Μετά το λουτρό, το διάλυμα φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου, συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό και ανακινείται για να αναμειχθεί. Η φιάλη τυλίγεται με ένα φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται σε ψυγείο. Να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μήνα.

3.5.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα olaquindox, 25 μg/ml

Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml μεταφέρονται 10,0 ml του αρχικού πρότυπου διαλύματος (3.5.1) το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.4) και ανακινείται για να αναμειχθεί καλά. Η φιάλη τυλίγεται με ένα φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται σε ψυγείο. Να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μήνα.

3.5.3. Διαλύματα αναφοράς:

Σε μία σειρά από ογκομετρικές φιάλες των 50 ml, μεταγγίζονται 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 και 20,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.5.2). Τα διαλύματα συμπληρώνονται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.4), ανακινούνται και στη συνέχεια οι φιάλες τυλίγονται με ένα φύλλο αλουμινίου. Τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν σε 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 και 10,0 μg olaquindox ανά ml. Κάθε μέρα πρέπει να παρασκευάζονται φρέσκα διαλύματα.

4. **Συσκευές**

4.1. Λουτρό υπερήχων

4.2. Μηχανικός αναδευτήρας

4.3. Εξοπλισμός για HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους μεταβλητού μήκους κύματος ή με ανιχνευτή διόδων.

4.3.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας, 250 mm × 4 mm, πληρωτικό υλικό C18, 10 μm ή ισοδύναμη με αυτή στήλη.

4.4. Φίλτρα μεμβράνης, 0,45 μm.

5. **Τρόπος εργασίας**

Σημείωση: Το olaquindox παρουσιάζει ευαισθησία στο φως, γι' αυτό όλες οι εργασίες πρέπει να εκτελούνται με χαμηλό φωτισμό ή να χρησιμοποιούνται κιτρινωπά γυάλινα σκεύη.

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Κατ' αρχήν, πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση ένα τυφλό δείγμα για να επιβεβαιώνεται ότι αυτό είναι απηλλαγμένο από olaquindox ή άλλες παρεμβαίνουσες προσμίξεις.

5.1.2. Πρέπει να εκτελείται δοκιμή ανάκτησης υποβάλλοντας σε ανάλυση το τυφλό olaquindox, παρόμοια με εκείνη του δείγματος. Για να επιτευχθεί εμπλουτισμός της τάξης των 50 mg/kg, σε κωνική φιάλη των 250 ml μεταφέρονται 10,0 ml του αρχικού προτύπου διαλύματος (3.5.1) και το διάλυμα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 0,5 ml. Προστίθενται 50 g του τυφλού, η φιάλη ανακινείται επισταμένως και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά, ανακινώντας την και πάλι μερικές φορές πριν να προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, το τυφλό πρέπει να είναι παρόμοιου τύπου με εκείνον του δείγματος και να μην ανιχνεύεται σε αυτό olaquindox.

5.2. *Εκχύλιση*

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,01 g περίπου 50 g του δείγματος. Η ποσότητα αυτή του δείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 1 000 ml, προστίθενται 100 ml μεθανόλης (3.1) και η φιάλη τοποθετείται για 5 λεπτά στο λουτρό υπερήχων (4.1). Προστίθενται 410 ml ύδατος και η φιάλη αφήνεται στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά ακόμη. Η φιάλη απομακρύνεται από το λουτρό υπερήχων, το περιεχόμενο αναταράσσεται για 30 λεπτά στον αναδευτήρα (4.2) και διηθείται με πτυχωτό ηθμό. Μεταφέρονται 10ml του διηθήματος σε μια βαθμολογημένη φιάλη των 20 ml, συμπληρώνεται με νερό και αναμειγνύεται. Φιλτράρεται ένα κλάσμα μέσω φίλτρου μεμβράνης (4.4) (βλέπε σημείωση 9). Συνεχίζεται ο προσδιορισμός στην HPLC (5.3).

5.3. *Προσδιορισμός HPLC*

5.3.1. Παράμετροι

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού συνιστάται η χρήση των παρακάτω συνθήκων, χωρίς να αποκλείεται η χρήση και άλλων συνθηκών υπό την προϋπόθεση ότι λαμβάνονται ισοδύναμα αποτελέσματα.

Αναλυτική στήλη (4.3.1.)

Κινητή φάση (3.4):	μείγμα νερού (3.3)—μεθανόλης (3.2) 900 + 100 (V + V)
Ταχύτητα ροής:	1,5—2 ml/min
Μήκος κύματος:	380 nm
Εγχυόμενος όγκος:	20 μl-100 μl

Ελέγχεται η σταθερότητα του χρωματογραφικού συστήματος, εγχύοντας επανειλημμένως το διάλυμα αναφοράς (3.5.3) που περιέχει 2,5 μg/ml, μέχρι να επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών και χρόνοι κατακράτησης.

5.3.2. Καμπύλη αναφοράς

Κάθε διάλυμα αναφοράς (3.5.3) εγχύεται επανειλημμένως και προσδιορίζεται για κάθε συγκέντρωση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών. Η καμπύλη αναφοράς χαράσσεται θέτοντας τα μέσα ύψη (εμβαδά) των κορυφών των διαλυμάτων αναφοράς στον άξονα των τεταγμένων και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml στον άξονα των τετμημένων.

5.3.3. Δείγμα υπό μορφή διαλύματος

Χρησιμοποιώντας τον ίδιο όγκο με εκείνο που χρησιμοποιείται και στην περίπτωση των διαλυμάτων αναφοράς, το δείγμα-διάλυμα (5,2) εγχύεται επανειλλημένως και προσδιορίζεται το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του olaquindox.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Η περιεκτικότητα σε olquindox του υπό μορφή διαλύματος δείγματος προσδιορίζεται σε μg/ml από το μέσω ύψος (εμβαδόν) των κορυφών του olaquindox του εν λόγω δείγματος, με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).

Η περιεκτικότητα w του δείγματος σε olaquindox σε mg/kg υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

όπου:

c = η συγκέντρωση του olaquindox στο δείγμα διάλυμα (5.2) σε μg/ml

m = η μάζα του εξεταζόμενου δείγματος σε g.

7. **Επιβεβαίωση της εγκυρότητας**

7.1. *Ταυτότητα*

Η ταυτότητα της αναλυόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή χρησιμοποιώντας ένα ανιχνευτή διόδων με τον οποίο συγκρίνονται τα φάσματα του υπό μορφή διαλύματος (5.2) και του διαλύματος αναφοράς (3.5.3) που περιέχει 5,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Δείγμα-διάλυμα (5.2) εμπλουτίζεται προσθέντοντας κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αναφοράς (3.5.3). Η ποσότητα του προστιθέμενου olaquindox πρέπει να είναι παρόμοια με την ποσότητα του olaquindox που υπάρχει στο δείγμα (5,2).

Θα πρέπει να εμφανίζεται ενίσχυση μόνο της κορυφής που αντιστοιχεί στο olaquindox ανάλογα τόσο με την προστεθείσα ποσότητα όσο και με την αραίωση του διαλύματος. Το εύρος της κορυφής, στο ήμισυ του ύψους της, πρέπει να κυμαίνεται στο ± 10 % του αρχικού εύρους της κορυφής του olaquindox του μη εμπλουτισμένου δείγματος (5,2).

7.1.2. Ανίχνευση με ανιχνευτή διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

α) το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης του δείγματος και των πρότυπων φασμάτων, που αντιστοιχεί στο ανώτατο συμείο της κορυφής στο χρωματογράφημα, πρέπει να κυμαίνεται σε όριο που καθορίζονται από την αναλυτική ισχύ του συστήματος ανίχνευσης. Για ανίχνευση με διόδους, τα όρια αυτά είναι συνήθως ± 2 nm·

β) μεταξύ 200 και 400 nm, το δείγμα και τα πρότυπα φάσματα που αντιστοιχούν στο ανώτατο σημείο της κορυφής του χρωματογραφήματος, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα μέρη εκείνα του φάσματος που εμπίπτουν στην περιοχή του 10-100 % σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό θεωρείται ότι πληρούται όταν τα εμφανιζόμενα μέγιστα είναι τα ίδια και σε κανένα από τα παρατηρούμενα σημεία η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης της πρότυπης αναλυόμενης ουσίας·

γ) μεταξύ 220 και 400 nm, τα φάσματα της ανωφέρειας, του ανώτατου σημείου και της κατωφέρειας της κορυφής που δίνει το δείγμα-διάλυμα δεν πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους στα σημεία εκείνα του φάσματος που εμπίπτουν στην περιοχή του 10-100 % σχετικής απορρόφησης. Το κριτήριο αυτό θεωρείται ότι πληρούται όταν τα εμφανιζόμενα μέγιστα είναι τα ίδια και όταν σε όλα τα παρατηρούμενα σημεία η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος του ανώτατου σημείου της κορυφής.

Εφόσον ένα οποιοδήποτε από τα παραπάνω κριτήρια δεν πληρούνται, τότε δεν μπορεί θεωρηθεί ότι βεβαιώθηκε η παρουσία της αναλυόμενης ουσίας.

7.2. *Επαναληψιμότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15 % σε σχέση με την υψηλότερη τιμή για συγκεντρώσεις olaquindox μεταξύ 10 και 200 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Σε ένα εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, η ανάκτηση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 %.

8. **Αποτελέσματα συνεργατικής μελέτης**

Πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της Κοινότητας συνεργατική μελέτη στην οποία 4 δείγματα χοιροτροφής, συμπεριλαμβανομένου και ενός τυφλού, αναλύθηκαν σε 13 εργαστήρια. Τα αποτελέσματα δίδονται κατωτέρω:

	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
μ (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S_r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV_r (%)	—	5,6	4,3	6,7
CV_R (%)	—	11,1	8,9	8,8
Ονομαστικό περιεχόμενο (mg/kg)	—	15	50	100
ανάκτηση (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : αριθμός εργαστηρίων
n : αριθμός μοναδικών τιμών
S_r : τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας
S_R : τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
CV_r : συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας
CV_R : συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας.

9. **Παρατήρηση**

Αν και η μέθοδος δεν έχει αξιολογηθεί για τροφές περιέχουσες περισσότερο από 100 mg/kg olaquindox, είναι δυνατόν να επιτευχθούν ικανοποιητικά αποτελέσματα παίρνοντας μικρότερη ποσότητα δείγματος ή/και αραιώνοντας το εκχύλισμα (5.2) ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις μέσα στα όρια της καμπύλης αναφοράς (5.3.2).