31998L0064

DIRECTIVA 98/64/CE A COMISIEI
din 3 septembrie 1998
de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru determinarea aminoacizilor, uleiurilor și grăsimilor brute și a olaquindoxului din furaje și de modificare a Directivei 71/393/CEE

(Text cu relevanță pentru SEE)

COMISIA COMUNITĂȚILOR EUROPENE,

având în vedere Tratatul de instituire a Comunității Europene,

având în vedere Directiva 70/373/CEE a Consiliului din 20 iulie 1970 privind introducerea modalităților de prelevare de probe și a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([1]), modificată ultima dată de actul de aderare a Austriei, Finlandei și Suediei, în special articolul 2,

întrucât Directiva 70/373/CEE prevede că efectuarea controalelor oficiale ale furajelor pentru a verifica respectarea cerințelor care decurg din actele cu putere de lege și actele administrative ce reglementează calitatea și compoziția furajelor trebuie să se deruleze folosind modalitățile de prelevare de probe și metodele de analiză comunitare;

întrucât Directiva 79/373/CEE a Consiliului din 2 aprilie 1979 privind comercializarea furajelor combinate ([2]), modificată ultima dată de Directiva 97/47/CE a Comisiei ([3]), și Directiva 93/74/CEE a Consiliului din 13 septembrie 1993 privind hrana pentru scopuri nutriționale speciale ([4]), modificată ultima dată de Directiva 96/25/CE ([5]), prevăd că aminoacizii și uleiurile și grăsimile brute trebuie menționate pe eticheta furajelor;

întrucât Directiva 70/524/CEE a Consiliului din 23 noiembrie 1970 privind aditivii din hrana pentru animale ([6]), modificată ultima dată de Directiva 98/19/CE a Comisiei ([7]), prevede necesitatea de a se menționa pe etichetă conținutul de olaquindox, atunci când această substanță este adăugată în furajele combinate;

întrucât a doua Directivă 71/393/CEE a Comisiei din 18 noiembrie 1971 de stabilire a metodelor comunitare de analiză pentru controlul oficial al furajelor ([8]), modificată ultima dată de Directiva 84/4/CEE a Comisiei ([9]) stabilește metodele de analiză pentru, *inter alia*, determinarea uleiurilor și grăsimilor brute; întrucât este oportun să se modifice metoda descrisă;

întrucât se impune stabilirea unor metode comunitare de analiză pentru verificarea acestor substanțe;

întrucât măsurile prevăzute în prezenta directivă sunt în conformitate cu avizul Comitetului permanent pentru furaje,

ADOPTĂ PREZENTA DIRECTIVĂ:

Articolul 1

Statele membre prevăd ca analizele efectuate pentru controlul oficial al conținutului de aminoacizi, uleiuri și grăsimi brute și olaquindox din furaje să se realizeze pe baza metodelor stabilite în anexa la prezenta directivă.

Articolul 2

În anexa la Directiva 71/393/CEE a Comisiei, punctul „4. Determinarea uleiurilor și grăsimilor brute" se înlocuiește cu partea B din anexa la prezenta directivă.

Articolul 3

(1) Statele membre pun în aplicare actele cu putere de lege și actele administrative necesare pentru a se conforma prezentei directive până la 31 decembrie 1998. Statele membre informează de îndată Comisia cu privire la aceasta.

Statele membre aplică aceste acte începând cu 1 ianuarie 1999.

Atunci când statele membre adoptă aceste acte, ele cuprind o trimitere la prezenta directivă sau sunt însoțite de o asemenea trimitere la data publicării lor oficiale. Statele membre stabilesc modalitatea de efectuare a acestei trimiteri.

([1]) JO L 170, 3.8.1970, p. 2.
([2]) JO L 86, 6.4.1979, p. 30.
([3]) JO L 211, 5.8.1997, p. 45.
([4]) JO L 237, 22.9.1993, p. 23.
([5]) JO L 125, 23.5.1996, p. 35.
([6]) JO L 270, 14.12.1970, p. 1.
([7]) JO L 96, 28.3.1998, p. 39.
([8]) JO L 279, 20.12.1971, p. 7.
([9]) JO L 15, 18.1.1984, p. 28.

(2) Statele membre comunică Comisiei textul principalelor dispoziții de drept intern pe care le adoptă în domeniul reglementat de prezenta directivă.

Articolul 4

Prezenta directivă intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Comunităților Europene*.

Articolul 5

Prezenta directivă se adresează statelor membre.

Adoptată la Bruxelles, 3 septembrie 1998.

Pentru Comisie

Franz FISCHLER

Membru al Comisiei

ANEXĂ

PARTEA A

DETERMINAREA AMINOACIZILOR

1. **Obiect și domeniu de aplicare**

Prezenta metodă permite determinarea aminoacizilor liberi (de sinteză și naturali) și totali (legați de peptide și liberi) din hrana pentru animale, folosind un analizator de aminoacizi. Ea se aplică următorilor aminoacizi: cist(e)ină, metionină, lizină, treonină, alanină, arginină, acid aspartic, acid glutamic, glicină, histidină, izoleucină, leucină, fenilalanină, prolină, serină, tirozină și valină.

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

2. **Principiu**

2.1. *Aminoacizi liberi*

Aminoacizii liberi se extrag cu acid clorhidric diluat. Macromoleculele de azot coextrase se precipită cu acid sulfosalicilic și se elimină prin filtrare. Soluția filtrată se aduce la un pH de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie prin schimb ionic și se determină prin reacție cu ninhidrină cu detecție fotometrică la 570 nm.

2.2. *Aminoacizi totali*

Procedura aleasă depinde de aminoacizii care sunt analizați. Cist(e)ina și metionina trebuie oxidate la acid cisteic și, respectiv, metionin sulfonă înainte de hidroliză. Tirozina trebuie determinată în hidrolizați de probe neoxidate. Toți ceilalți aminoacizi enumerați la punctul 1 se pot determina fie în proba oxidată, fie în proba neoxidată.

Oxidarea se realizează la 0 °C cu amestec de acid performic și fenol. Reactivul de oxidare în exces se descompune cu disulfit de sodiu. Proba oxidată sau neoxidată se hidrolizează cu acid clorhidric (c = 6 mol/l) timp de 23 ore. Hidrolizatul se aduce la un pH de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie prin schimb ionic și se determină prin reacție cu ninhidrină folosind detecția fotometrică la 570 nm (440 nm pentru prolină).

3. **Reactivi**

Trebuie să se utilizeze apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductibilitate < 10 μS).

3.1. Apă oxigenată, 30 % (m/m).

3.2. Acid formic, 98-100 % (m/m).

3.3. Fenol.

3.4. Disulfit de sodiu.

3.5. Hidroxid de sodiu.

3.6. Dihidrat acid 5-sulfosalicilic.

3.7. Acid clorhidric, densitate aproximativ 1,18 g/ml.

3.8. Citrat de trisodiu dehidratat.

3.9. 2,2′-tiodietanol (tiodiglicol).

3.10. Clorură de sodiu.

3.11. Ninhidrină.

3.12. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C.

3.13. Norleucină sau alt compus adecvat pentru utilizare ca etalon intern.

3.14. Azot gazos (< 10 ppm oxigen).

3.15. 1-octanol.

3.16. Aminoacizi.

3.16.1. Substanțe etalon enumerate la punctul 1. Compuși puri fără conținut de apă de cristalizare. Se usucă sub vid pe P_2O_5 sau H_2SO_4 timp de o săptămână înainte de utilizare.

3.16.2. Acid cisteic.

3.16.3. Metionin sulfonă.

3.17. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 7,5 mol/l:

se dizolvă 300 g NaOH (3.5) în apă și se completează până la 1 litru.

3.18. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l:

se dizolvă 40 g NaOH (3.5) în apă și se completează până la 1 litru.

3.19. Soluție de acid formic-fenol:

se amestecă 889 g de acid formic (3.2) cu 111 g apă și se adăugă 4,73 g fenol (3.3).

3.20. Amestec de hidroliză, c = 6 moli HCl/l conținând 1 g fenol/l:

se adăugă 1 g fenol (3.3) la 492 ml HCl (3.7) și se completează până la 1 l cu apă.

3.21. Amestec de extracție, c = 0,1 moli HCl/l conținând 2 % tiodiglicol:

se iau 8,2 ml HCl (3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml apă, se adaugă 20 ml tiodiglicol (3.9) și se completează până la 1 litru cu apă (nu se amestecă direct 3.7 cu 3.9).

3.22. Acid 5-sulfosalicilic, ß = 6 %:

se dizolvă 60 g acid 5-sulfosalicilic (3.6) în apă și se completează până la 1 litru cu apă.

3.23. Amestec de oxidare (acid performic-fenol):

se amestecă 0,5 ml apă oxigenată (3.1) cu 4,5 ml soluție acid formic-fenol (3.19) într-un pahar mic de laborator. Se incubează la 20-30 °C timp de 1 oră pentru a obține acidul performic, apoi se răcește pe o baie de apă cu gheață (15 minute) înainte de a se adăuga la probă.

Atenție: a se evita contactul cu pielea și a se purta îmbrăcăminte de protecție.

3.24. Tampon cu citrat, c = 0,2 moli Na^+/l, pH 2,20:

se dizolvă 19,61 g citrat de sodiu (3.8), 5 ml tiodiglicol (3.9), 1 g fenol (3.3) și 16,50 ml HCl (3.7) în aproximativ 800 ml apă. Se aduce pH-ul la 2,20. Se completează până la 1 litru cu apă.

3.25. Tampoane de eluare, preparate conform condițiilor prevăzute pentru analizatorul utilizat (4.9).

3.26. Reactiv cu ninhidrină, preparat conform condițiilor prevăzute pentru analizatorul utilizat (4.9).

3.27. Soluții etalon de aminoacizi. Aceste soluții trebuie conservate la o temperatură mai mică de 5 °C.

3.27.1. Soluție etalon mamă de aminoacizi (3.16.1). c = 2,5 µmol/ml din fiecare în acid clorhidric. Pot fi procurate din comerț.

3.27.2. Soluție etalon mamă de acid cisteic și metionin sulfonă, c = 1,25 µmol/ml.

Se dizolvă 0,2115 g acid cisteic (3.16.2) și 0,2265 g metionin sulfonă (3.16.3) în tampon cu citrat (3.24) într-un balon gradat și se completează până la nivel cu tampon cu citrat. Se conservă la o temperatură sub 5 °C timp de maximum 12 luni. Această soluție nu se folosește dacă soluția etalon mamă (3.27.1) conține acid cisteic și metionin sulfonă.

3.27.3. Soluție etalon din etalonul intern, de exemplu norleucină, c = 20 µmol/ml.

Se dizolvă 0,6560 g norleucină (3.13) în tampon cu citrat (3.24) într-un balon gradat și se completează până la 250 ml cu tampon cu citrat. Se conservă la o temperatură sub 5 °C timp de maximum 6 luni.

3.27.4. Soluție de etalonare de aminoacizi standard pentru utilizare cu hidrolizați, c = 5 nmol/50 µl de acid cisteic și metionin sulfonă și c = 10 nm/50 µl de alți aminoacizi.

Se dizolvă 2,2 g clorură de sodiu (3.10) într-un pahar de laborator de 100 ml cu 30 ml tampon cu citrat. Se adăugă 4,00 ml soluție etalon de aminoacizi (3.27.1), 4,00 soluție etalon de acid cisteic și metionin sulfonă (3.27.2) și 0,50 ml soluție etalon din etalonul intern (3.27.3), dacă este cazul. Se aduce pH-ul la 2,20 cu hidroxid de sodiu (3.18).

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

Se conservă la o temperatură sub 5 °C timp de maximum 3 luni.

A se vedea, de asemenea, observațiile de la punctul 9.1.

3.27.5. Soluție de etalonare de aminoacizi standard pentru utilizare cu hidrolizați preparați conform punctului 5.3.3.1 și destinați utilizării cu extracte (5.2). Soluția de etalonare se prepară conform punctului 3.27.4, dar fără clorură de sodiu.

Se conservă la o temperatură sub 5 °C timp de maximum 3 luni.

4. **Aparatură**

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

4.2. Flacon de sticlă de borosilicat de 100 ml cu dop cu șurub cu garnitură de cauciuc/teflon (de exemplu Duran, Schott) pentru folosire în cuptor.

4.3. Cuptor cu ventilare forțată și regulator de temperatură cu precizie mai mare de ± 2 °C.

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

4.5. Membrană filtrantă (0,2 µm).

4.6. Centrifugă.

4.7. Evaporator rotativ cu vid.

4.8. Agitator mecanic sau magnetic.

4.9. Analizator de aminoacizi sau echipament CLIP cu coloană cu schimb ionic, dispozitiv pentru ninhidrină, derivatizare postcoloană și detector fotometric.

Coloana se umple cu rășini sulfonate de polistiren care pot separa aminoacizii între ei și aminoacizii de alte produse cu reacție la ninhidrină. Debitul din tampon și din reactivul de ninhidrină este asigurat de pompe cu o stabilitate a debitului de ± 0,5 % în intervalul care acoperă atât analiza soluției de etalonare, cât și analiza probei.

La unii analizatori de aminoacizi se pot utiliza metode de hidroliză în care hidrolizatul are o concentrație de sodiu de c = 0,8 mol/l și conține întregul acid formic rezidual rezultat din etapa de oxidare. Alți analizatori nu oferă o separare satisfăcătoare a anumitor aminoacizi dacă hidrolizatul conține acid formic în exces și/sau concentrații ridicate de ioni de sodiu. În acest caz, volumul de acid se reduce prin evaporare la aproximativ 5 ml după hidroliză și înainte de ajustarea pH-ului. Evaporarea trebuie efectuată sub vid la maximum 40 °C.

5. **Procedură**

5.1. *Prepararea probei*

Proba se macină astfel încât să treacă printr-o sită de 0,5 mm. Probele cu conținut ridicat de umiditate trebuie uscate fie cu aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie prin liofilizare înainte de măcinare. Probele cu conținut ridicat de grăsimi trebuie extrase cu eter de petrol (3.12) înainte de măcinare.

5.2. Determinarea aminoacizilor liberi din hrana pentru animale și preamestecuri

Se cântărește cu o aproximare de 0,2 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din proba preparată (5.1), într-un balon conic și se adăugă 100,0 ml de amestec de extracție (3.21). Se agită amestecul timp de 60 minute folosind un agitator mecanic sau magnetic (4.8). Se lasă sedimentul să se așeze și se pipetează 10,0 ml de soluție supernatant într-un pahar de laborator de 100 ml.

Se adăugă 5,0 ml de soluție de acid sulfosalicilic (3.22), agitând continuu cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 5 minute. Se filtrează și se centrifughează faza de supernatant pentru a elimina eventualul precipitat. Se introduc 10,0 ml din soluția obținută într-un pahar de laborator de 100 ml și se aduce pH-ul la 2,20 folosind o soluție de hidroxid de sodiu (3.18), se transferă într-un balon cotat de volum adecvat folosind tampon cu citrat (3.24) și se completează până la nivel cu soluție tampon (3.24).

Dacă se folosește un etalon intern, se adaugă 1,00 ml de etalon intern (3.27.3) pentru fiecare 100 ml de soluție finală și se completează până la nivel cu soluție tampon (3.24).

Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Dacă extractele nu sunt examinate în aceeași zi, ele trebuie conservate la o temperatură sub 5 °C.

5.3. *Determinarea aminoacizilor totali*

5.3.1. Oxidare

Se cântărește, cu o aproximare de 0,2 mg, între 0,1 și 1 g din proba preparată (5.1) într-un:

— balon cu fund rotund de 100 ml (4.1) pentru hidroliză deschisă (5.3.2.3) sau

— balon cu fund rotund de 250 ml (4.1), dacă este necesară o concentrație scăzută de sodiu (5.3.3.1) sau

— flacon de 100 ml prevăzut cu dop cu șurub (4.2) (pentru hidroliză închisă 5.3.2.4).

Porția cântărită din probă trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg și un conținut de umiditate de maximum 100 mg.

Se introduce balonul/flaconul într-o baie de apă cu gheață și se răcește până la 0 °C, se adaugă 5 ml de amestec de oxidare (3.23) și se amestecă folosind o spatulă de sticlă cu vârf curbat. Se sigilează balonul/flaconul care conține spatula cu un film impermeabil la aer, se introduce baia de apă cu gheață care conține recipientul sigilat într-un frigider la 0 °C și se lasă timp de 16 ore. După 16 ore, se scoate baia din frigider și se descompune reactivul de oxidare în exces prin adăugarea a 0,84 g de disulfit de sodiu (3.4).

Se trece la punctul 5.3.2.1.

5.3.2. Hidroliză

5.3.2.1. Hidroliza probelor oxidate

La proba oxidată preparată conform punctului 5.3.1 se adaugă 25 ml de amestec de hidroliză (3.20), având grijă să se elimine prin spălare orice reziduu de probă de pe pereții recipientului și de pe spatulă. În funcție de metoda de hidroliză utilizată, se continuă cu punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hidroliza probelor neoxidate

Se cântărește fie într-un balon cu fund rotund de 100 ml sau de 250 ml (4.1), fie într-un flacon de 100 ml prevăzut cu dop cu șurub (4.2), cu o aproximare de 0,2 mg, o cantitate de 0,1-1 g din proba preparată (5.1). Porția cântărită din probă trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adăugă cu grijă 25 ml de amestec de hidroliză (3.20) și se amestecă cu proba. Se continuă fie cu punctul 5.3.2.3, fie cu punctul 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hidroliză deschisă

Se adăugă 3 bile de sticlă în amestecul din balon (preparat conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2) și se fierbe constant timp de 23 de ore. La finalizarea hidrolizei, se spală condensatorul cu 5 ml de tampon cu citrat (3.24). Se deconectează balonul și se răcește într-o baie de gheață. Se continuă conform punctului 5.3.3.

5.3.2.4. Hidroliză închisă

Se introduce flaconul care conține amestecul preparat conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2 într-un cuptor (4.3) la 110 °C. În timpul primei ore, pentru a preveni acumularea de presiune (datorită evoluției substanțelor gazoase) și pentru a evita explozia, se așează dopul cu șurub pe recipient. *Nu se închide recipientul înșurubând dopul*. După o oră, se închide recipientul cu dopul cu șurub și se lasă în cuptor (4.3) timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se scoate flaconul din cuptor, se deschide cu atenție dopul și se introduce flaconul într-o baie de apă cu gheață. Se lasă să se răcească.

În funcție de metoda de adaptare a pH-ului (5.3.3), se transferă cantitativ conținutul flaconului într-un pahar de laborator de 250 ml sau într-un balon cu fund rotund de 250 ml, folosind tampon cu citrat (3.24).

Se continuă conform punctului 5.3.3.

5.3.3. Ajustarea pH-ului

În funcție de toleranța la sodiu a analizatorului de aminoacizi (4.9), se continuă conform punctului 5.3.3.1 sau 5.3.3.2 pentru adaptarea pH-ului.

5.3.3.1. Pentru sistemele cromatografice (4.9) care necesită o concentrație scăzută de sodiu:

Se recomandă folosirea unei soluții etalon interne (3.27.3) atunci când sunt utilizați analizatori de aminoacizi care necesită o concentrație scăzută de sodiu (când volumul de acid trebuie redus).

În acest caz, se adaugă 2,00 ml din soluția etalon internă (3.27.3) la hidrolizat înainte de evaporare.

Se adaugă 2 picături de 1-octanol (3.15) la hidrolizatul obținut conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

Folosind un evaporator rotativ (4.7), se reduce volumul la 5-10 ml sub vid la 40 °C. Dacă volumul se reduce în mod întâmplător la mai puțin de 5 ml, hidrolizatul trebuie aruncat, iar analiza trebuie reîncepută.

Se aduce pH-ul la 2,20 cu soluție de hidroxid de sodiu (3.18) și se continuă conform punctului 5.3.4.

5.3.3.2. Pentru toți ceilalți analizatori de aminoacizi (4.9)

Se iau hidrolizații obținuți conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 și se neutralizează parțial adăugând cu atenție, prin agitare, 17 ml de soluție de hidroxid de sodiu (3.17), asigurând menținerea temperaturii sub 40 °C.

Se aduce pH-ul la 2,20 la temperatura camerei folosind soluție de hidroxid de sodiu (3.17) și, la final, soluție de hidroxid de sodiu (3.18). Se continuă cu punctul 5.3.4.

5.3.4. Probă în soluție pentru cromatografie

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

Dacă etalonul intern nu a fost încă folosit, se adaugă 2,00 ml de etalon intern (3.27.3) și se completează până la nivel cu tampon cu citrat (3.24). Se amestecă bine.

Se continuă cu etapa de cromatografie (5.4).

Dacă probele în soluție nu sunt examinate în aceeași zi, ele trebuie conservate la o temperatură mai mică de 5 °C.

5.4. *Cromatografie*

Înainte de cromatografie, se aduce extractul (5.2) sau hidrolizatul (5.3.4) la temperatura camerei. Se agită amestecul și se filtrează o cantitate adecvată printr-o membrană filtrantă de 0,2 µm (4.5). Soluția limpede obținută este supusă cromatografiei prin schimb ionic, folosind un analizator de aminoacizi (4.9).

Injectarea se poate efectua manual sau automat. Este important ca aceeași cantitate de soluție ± 0,5 % să se adauge la coloană pentru analiza etaloanelor și probelor, cu excepția cazurilor în care se utilizează un etalon intern, și ca rapoartele sodiu:aminoacid din soluțiile etalon și de probă să fie cât mai apropiate posibil.

În general, frecvența injectărilor soluției etalon depinde de stabilitatea reactivului cu ninhidrină și a sistemului analitic. Etalonul sau proba se diluează cu tampon cu citrat (3.24) pentru a obține o suprafață a maximelor etalonului de 30-200 % din suprafața maximelor aminoacidului din probă.

Cromatografia aminoacizilor diferă ușor în funcție de tipul de analizator folosit și de rășina utilizată. Sistemul ales trebuie să poată separa aminoacizii între ei și aminoacizii de produsele cu reacție la ninhidrină. În cursul operațiunii, sistemul cromatografic trebuie să ofere un răspuns liniar la modificările cantităților de aminoacizi adăugate la coloană.

În timpul fazei de cromatografie, rapoartele dintre înălțimea punctelor de inflexiune și a punctelor de maxim menționate în continuare se aplică atunci când se analizează o soluție echimolară (a aminoacizilor determinați). Soluția echimolară trebuie să conțină cel puțin 30 % din sarcina maximă a fiecărui aminoacid care poate fi măsurată exact cu sistemul de analiză a aminoacizilor (4.9).

Pentru separarea treonină-serină, raportul dintre înălțimea punctului de inflexiune și a punctului de maxim pentru cel mai scăzut dintre cei doi aminoacizi care se suprapun pe cromatogramă nu trebuie să fie mai mare de 2:10 [dacă se determină doar cist(e)ina, metionina, treonina și lizina, o separare insuficientă a maximelor vecine va influența negativ determinarea]. Pentru toți ceilalți aminoacizi, separarea trebuie să fie mai bună de 1:10.

Sistemul trebuie să asigure că lizina este separată de „artefactele de lizină” și de ornitină.

6. **Calcularea rezultatelor**

Suprafața maximelor probei și etalonului se măsoară pentru fiecare aminoacid în parte și se calculează cantitatea, în g de aminoacid per kg de probă.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminoacid per kg de probă}$$

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

unde:

A = suprafața maximelor, hidrolizat sau extract

B = suprafața maximelor, soluție de etalonare

C = suprafața maximelor, etalon intern în hidrolizat sau în extract

D = suprafața maximelor, etalon intern, soluție de etalonare

MM = masa moleculară a aminoacidului determinat

E = concentrația etalonului în µmol/ml

M = masa probei (g) (corectată la masa inițială dacă produsul este uscat sau degresat)

F = ml de hidrolizat total (5.3.4) sau ml de volum de diluție total calculat al extractului (6.1).

Cistina și cisteina se determină amândouă ca acid cisteic în hidrolizați de probă oxidată, dar se calculează ca cistină ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MM 240,30) folosind MM 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionina se determină ca metionin sulfonă în hidrolizați de probă oxidată, dar se calculează ca metionină folosind o MM de 149,21 de metionină.

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

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

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

V = volumul extractului final

7. **Evaluarea metodei**

Metoda a fost testată într-o comparație între laboratoare realizată la nivel internațional în 1990, folosind patru tipuri de hrană pentru animale (hrană compusă pentru porci, hrana compusă pentru pui de carne, concentrat proteic, preamestec). Rezultatele, după eliminarea valorilor aberante, pentru abaterea medie și standard sunt prezentate în tabelul următor:

Medii în g/kg

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

n = număr de laboratoare participante

7.1. *Repetabilitate*

Repetabilitatea exprimată ca „abatere standard în cadrul laboratorului" a comparației între laboratoare menționate este prezentată în tabelele următoare:

Abatere standard în cadrul laboratorului (S_r) în g/kg

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

n = număr de laboratoare participante

Coeficient de variație (%) pentru abaterea standard în cadrul laboratorului (S_r)

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Hrana compusă pentru porci	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Hrana compusă pentru pui de carne	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrat proteic	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Preamestec	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = număr de laboratoare participante

7.2. *Reproductibilitate*

Rezultatele pentru abaterea standard între laboratoare pentru comparația între laboratoare menționată anterior sunt prezentate în tabelul următor:

Abatere standard între laboratoare (S_R) în g/kg

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

n = număr de laboratoare participante

Coeficient de variație (%) pentru abaterea standard între laboratoare (S_R)

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Hrana compusă pentru porci	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Hrana compusă pentru pui de carne	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrat proteic	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Preamestec	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = număr de laboratoare participante

8. **Utilizarea materialelor de referință**

Aplicarea corectă a metodei se verifică prin efectuarea de măsurări duble ale materialelor de referință certificate, atunci când acestea sunt disponibile. Se recomandă etalonarea cu soluție de etalonare de aminoacid certificată.

9. **Observații**

9.1. Datorită diferențelor dintre analizatorii de aminoacizi, concentrațiile finale ale soluțiilor de etalonare a aminoacizilor etalon (vezi 3.27.4 și 3.27.5) și a hidrolizatului (vezi 5.3.4) trebuie considerate ca fiind orientative.

Intervalul răspunsului liniar al aparatului trebuie verificat pentru toți aminoacizii.

Soluția etalon se diluează cu tampon cu citrat pentru a genera suprafețe ale maximelor situate la mijlocul intervalului.

9.2. În cazul în care se folosește o aparatură de cromatografie lichidă de înaltă performanță pentru analizarea hidrolizaților, condițiile experimentale trebuie optimizate în conformitate cu recomandările fabricantului.

9.3. Prin aplicarea metodei la hrana pentru animale care conține peste 1 % clorură (concentrat, supliment de minerale, hrană complementară) poate apărea o subestimare a metioninei și trebuie să se efectueze o tratare specială.

PARTEA B

DETERMINAREA ULEIURILOR ŞI GRĂSIMILOR BRUTE

1. **Obiect şi domeniu de aplicare**

Prezenta metodă este destinată determinării uleiurilor și grăsimilor brute din hrana pentru animale. Ea nu include analiza semințelor și fructelor oleaginoase definite în Regulamentul 136/66/CEE al Consiliului din 22 septembrie 1966.

Utilizarea celor două procedee descrise în continuare depinde de natura și compoziția furajului și de motivul efectuării analizei.

1.1. *Procedeul A – Uleiuri şi grăsimi brute extrase direct*

Această metodă se aplică materiilor prime pentru hrana animalelor de origine vegetală, cu excepția celor incluse în domeniul de aplicare a procedeului B.

1.2. *Procedeul B – Uleiuri şi grăsimi brute totale*

Această metodă se aplică materiilor prime de origine animală și hranei compuse. Ea trebuie folosită pentru toate produsele din care uleiurile și grăsimile nu pot fi extrase complet fără hidroliză prealabilă (de exemplu gluten, drojdie, proteine de cartofi și produse supuse unor procese cum ar fi extrudarea, scămoșarea și încălzirea).

1.3. *Interpretarea rezultatelor*

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

2. **Principiu**

2.1. *Procedeul A*

Proba se extrage cu eter de petrol. Solventul se distilează, iar reziduul se usucă și se cântărește.

2.2. *Procedeul B*

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

3. **Reactivi**

3.1. Eter de petrol, interval de fierbere: 40-60 °C. Indicele de brom trebuie să fie mai mic de 1, iar reziduul după evaporare sub 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfat de sodiu, anhidru.

3.3. Acid clorhidric, c = 3 moli HCl/l

3.4. Adjuvant de filtrare, de exemplu Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. **Aparatură**

4.1. Aparat de extracție. Dacă este prevăzut cu un sifon (aparat Soxhlet), debitul de reflux trebuie reglat în așa fel încât să producă aproximativ 10 cicluri pe oră; dacă aparatul este de tip fără sifon, debitul de reflux trebuie să fie de aproximativ 10 ml pe minut.

4.2. Cartușe de extracție, fără materie solubilă în eter de petrol și cu o porozitate compatibilă cu cerințele punctului 4.1.

4.3. Cuptor de uscare, fie un cuptor cu vid reglat la 75 °C ± 3 °C, fie un cuptor de uscare cu aer reglat la 100 °C ± 3 °C.

5. **Procedură**

5.1. *Procedeul A (a se vedea punctul 8.1)*

Se cântăresc 5 g de probă cu o aproximare de 1 mg, se transferă cantitatea într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de vată degresat.

Se așează cartușul într-un extractor (4.1) și se extrage timp de șase ore cu eter de petrol (3.1). Se colectează extractul de eter de petrol într-un balon uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce ([1]).

Se distilează solventul până la eliminare. Se usucă reziduul, păstrând balonul timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare (4.3). Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 minute pentru a asigura că greutatea uleiurilor și grăsimilor rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie sub 1 mg).

5.2. *Procedeul B*

Se cântăresc 2,5 g de probă cu aproximare de 1 mg (vezi punctul 8.2), se introduce cantitatea într-un pahar de laborator de 400 ml sau într-un balon conic de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric (3.3) și fragmente de piatră ponce. Se acoperă paharul de laborator cu o sticlă de ceas sau se conectează un condensator cu reflux la balonul conic. Se aduce amestecul la fierbere ușoară cu ajutorul unei mici flăcări sau a unei plite de încălzire și se păstrează recipientul timp de o oră. Trebuie să se împiedice lipirea produsului de părțile laterale ale recipientului.

Se răcește și se adaugă o cantitate de adjuvant de filtrare (3.4) suficientă pentru a evita pierderile de ulei și grăsime în timpul filtrării. Se filtrează printr-o hârtie de filtru dublă înmuiată și fără grăsimi. Se spală reziduul în apă rece până se obține un filtrat neutru. Se efectuează o verificare pentru a se asigura că filtratul nu conține uleiuri și grăsimi. Prezența acestora indică faptul că proba trebuie extrasă cu eter de petrol, folosind procedeul A, înainte de hidroliză.

Se așează hârtia de filtru dublă care conține reziduul pe o sticlă de ceas și se usucă timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare cu aer (4.3) la 100 °C ± 3 °C.

Se așează hârtia de filtru dublă care conține reziduul uscat într-un cartuș de extracție (4.2) și se acoperă cu un tampon de vată degresat. Se introduce cartușul într-un extractor (4.1) și se continuă conform paragrafelor al doilea și al treilea de la punctul 5.1.

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

6. **Exprimarea rezultatului**

Se exprimă greutatea reziduului ca procent din probă.

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă de același analizator nu trebuie să depășească:

— 0,2 % în valoare absolută, pentru conținuturile de uleiuri și grăsimi brute sub 5 %;

— 4,0 % față de rezultatul cel mai ridicat pentru conținuturi cuprinse între 5 și 10 %;

— 0,4 % în valoare absolută, pentru conținuturi de peste 10 %.

8. **Observații**

8.1. Pentru produse cu un conținut ridicat de uleiuri și grăsimi, care sunt dificil de măcinat sau inadecvate pentru prelevarea unei probe de testare reduse omogen, se procedează după cum urmează.

Se cântăresc 20 g de probă cu o aproximare de 1 mg și se amestecă cu o cantitate de 10 g sau mai mare de sulfat de sodiu anhidru (3.2). Se extrage cu eter de petrol (3.1) conform indicațiilor de la punctul 5.1. Se completează extractul obținut până la 500 ml cu eter de petrol (3.1) și se amestecă. Se introduc 50 ml din soluție într-un balon mic, uscat și cântărit care conține fragmente de piatră ponce ([1]). Se distilează solventul până la eliminare, se usucă și se continuă conform indicațiilor de la punctul 5.1 ultimul paragraf.

Se elimină solventul din reziduul de extracție rămas în cartuș, se macină reziduul la o finețe de 1 mm, se reintroduce în cartușul de extracție (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se continuă conform indicațiilor de la punctul 5.1 paragrafele al doilea și al treilea.

Se calculează conținutul de uleiuri și grăsimi ca procent din probă folosind următoarea formulă:

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

unde:

a = masa, în grame, a reziduului după prima extracție (parte alicotă din extract);

b = masa, în grame, a reziduului după a doua extracție.

8.2. Pentru produsele cu conținut scăzut de uleiuri și grăsimi, masa probei de testare poate fi mărită la 5 g.

8.3. Este posibil ca hrana pentru animalele de casă cu conținut ridicat de apă să trebuiască să fie amestecată cu sulfat de sodiu anhidru înainte de hidroliză și extracție conform procedeului B.

8.4. La punctul 5.2, poate fi mai eficientă folosirea apei calde în locul apei reci pentru spălarea reziduului după filtrare.

8.5. Este posibil să fie nevoie să se prelungească timpul de uscare de 1,5 h pentru unele tipuri de hrană pentru animale. Uscarea excesivă trebuie evitată, întrucât acest lucru poate determina rezultate scăzute. Se poate folosi, de asemenea, un cuptor cu microunde.

8.6. Preextracția prin procedeul A înainte de hidroliză și de reextracția prin procedeul B se recomandă în cazul în care conținutul de uleiuri/grăsimi brute este de peste 15 %. Într-o anumită măsură, acest lucru depinde de natura furajului și de natura uleiurilor/grăsimilor din furaj.

PARTEA C

DETERMINAREA OLAQUINDOXULUI

(2-[N-2′-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalină-N^1,N^4-dioxid)

1. **Obiect şi domeniu de aplicare**

Prezenta metodă are ca scop determinarea conținutului de olaquindox din hrana pentru animale. Limita inferioară de determinare este 5 mg/kg.

2. **Principiu**

Proba se extrage cu un amestec apă și metanol. Conținutul de olaquindox se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (CLIP) în fază inversă, folosind un detector UV.

([1]) Atunci când uleiurile sau grăsimile trebuie supuse unor teste de calitate ulterioare, se înlocuiesc fragmentele de piatră ponce cu bile de sticlă.

3. **Reactivi**

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, calitate CLIP.

3.3. Apă, calitate CLIP.

3.4. Fază mobilă pentru CLIP;

Amestec apă (3.3)-metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Substanță etalon: olaquindox pur 2-[N-2′-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalină-N^1,N^4-dioxid, E 851.

3.5.1. Soluție etalon mamă de olaquindox, 250 µg/ml

Se cântăresc, cu aproximare de 0,1 mg, 50 mg de olaquindox (3.5) într-un balon gradat de 200 ml și se adaugă circa 190 ml de apă. Apoi se introduce balonul timp de 20 minute într-o baie ultrasonică (4.1). După tratarea cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează cu apă până la nivel și se amestecă. Se învelește balonul cu folie de aluminiu și se conservă într-un frigider. Această soluție trebuie preparată proaspăt în fiecare lună.

3.5.2. Soluție etalon intermediară de olaquindox, 25 µg/ml

Se transferă 10,0 ml din soluția etalon mamă (3.5.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la nivel cu fază mobilă (3.4) și se amestecă. Se învelește balonul cu folie de aluminiu și se conservă într-un frigider. Această soluție trebuie preparată proaspăt în fiecare zi.

3.5.3. Soluții de etalonare:

Într-o serie de baloane gradate de 50 ml se transferă 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 și 20,0 ml din soluția etalon intermediară (3.5.2). Se completează până la nivel cu fază mobilă (3.4) și se amestecă. Se învelesc baloanele cu folie de aluminiu. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 și, respectiv, 10,0 µg de olaquindox per ml.

Aceste soluții trebuie preparate proaspăt în fiecare zi.

4. **Aparatură**

4.1. Baie ultrasonică

4.2. Agitator mecanic

4.3. Echipament CLIP cu detector UV cu lungime de undă variabilă sau cu detector cu sistem de diode

4.3.1. Coloană cromatografică lichidă, 250 mm x 4 mm, C18, particule de 10 µm sau echivalent

4.4. Membrane filtrante, 0,45 µm.

5. **Procedură**

Notă: Olaquindoxul este sensibil la lumină. Toate operațiile se efectuează sub lumină atenuată sau se folosește sticlărie de chihlimbar.

5.1. *Aspecte generale*

5.1.1. Trebuie să se analizeze un furaj martor pentru a garanta că acesta nu conține olaquindox și nici substanțe interferente.

5.1.2. Trebuie efectuat un test de recuperare prin analizarea furajului martor la care s-a adăugat o cantitate de olaquindox, similară cu cea prezentă în probă. Pentru a obține un nivel de 50 mg/kg, se transferă 10,0 ml din soluția etalon mamă (3.5.1) într-un balon conic de 250 ml și se evaporă soluția până la o concentrație de aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de câteva ori înainte de a continua cu etapa de extracție (5.2).

Notă: În sensul prezentei metode, furajul martor trebuie să fie de tip similar cu cel al probei și nu trebuie detectată nici o prezență de olaquindox.

5.2. *Extracție*

Se cântăresc, cu aproximare de 0,01 g, circa 50 g de probă. Se transferă cantitatea într-un balon conic de 1 000 ml, se adaugă 100 ml de metanol (3.1) și se introduce balonul timp de 5 minute în baia ultrasonică (4.1). Se adaugă 410 ml de apă și se lasă din nou balonul în baia ultrasonică pentru încă 15 minute. Se scoate balonul din baia ultrasonică, se agită timp de 30 minute pe un agitator (4.2) și se filtrează printr-un filtru pliat. Se transferă 10,0 ml de filtrat într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la nivel cu apă și se amestecă. O parte alicotă se filtrează printr-o membrană filtrantă (4.4) (a se vedea punctul 9 Observații). Se continuă cu determinarea CLIP (5.3).

5.3. *Determinarea CLIP*

5.3.1. Parametri:

Următoarele condiții sunt prezentate cu titlu orientativ, putând fi folosite și alte condiții dacă acestea oferă rezultate echivalente.

Coloană analitică (4.3.1)

Fază mobilă (3.4):	amestec apă (3.3) – metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)
Debit:	1,5-2 ml/min.
Lungime de undă de detecție:	380 nm
Volum de injecție:	20 µl-100 µl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectând de mai multe ori soluția de etalonare (3.5.3) care conține 2,5 µg/ml, până când se obțin înălțimi constante ale maximelor și timpi constanți de retenție.

5.3.2. Grafic de calibrare

Se injectează fiecare soluție de etalonare (3.5.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (suprafețele) medii ale maximelor pentru fiecare concentrație. Se stabilește un grafic de calibrare folosind înălțimile (suprafețele) medii ale maximelor soluțiilor de etalonare pe axa ordonatelor și concentrațiile corespunzătoare în µg/ml pe axa absciselor.

5.3.3. Probă în soluție

Se injectează extrasul de probă (5.2) de mai multe ori folosind același volum ca și cel reținut pentru soluțiile de etalonare și se determină înălțimea (suprafața) medie a maximelor pentru olaquindox.

6. **Calcularea rezultatelor**

Pornind de la înălțimea (suprafața) medie a maximelor pentru olaquindox ale soluției de probă, se determină concentrația soluției de probă în µg/ml prin raportare la graficul de calibrare (5.3.2).

Conținutul de olaquindox, w, în mg/kg din probă este dat de următoarea formulă:

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

unde:

c = concentrația de olaquindox din extractul de probă (5.2) în µg/ml

m = masa probei de testare, în g (5.2).

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. *Identitate*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau folosind un detector cu sistem de diode prin care se compară spectrele extractului de probă (5.2) și soluția de etalonare (3.5.3) care conține 5,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

La un extract de probă (5.2) se adaugă o cantitate adecvată de soluție de etalonare (3.5.3). Cantitatea de olaquindox adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de olaquindox descoperită în extractul de probă.

Doar înălțimea maximului de olaquindox trebuie mărită după ce se ia în considerare atât cantitatea adăugată, cât și diluția extractului. Lățimea maximului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să fie de ± 10 % din lățimea inițială a maximului de olaquindox al extractului de probă nesuplimentat.

7.1.2. Detecție cu sistem de diode

Rezultatele se evaluează în conformitate cu următoarele criterii:

(a) lungimea de undă de absorbție maximă a probei și a spectrelor etalon, înregistrată la apexul punctului de maxim de pe cromatogramă, trebuie să se încadreze într-un interval determinat de finețea de percepție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu sistem de diode, acest interval este de obicei de ± 2 nm;

(b) între 220 și 400 nm, spectrele de probă și de etalon înregistrate la apexul punctului de maxim al cromatogramei nu trebuie să fie diferite de zonele spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când abaterea între două spectre nu depășește 15 % din absorbanța analitului standard în nici un punct observat;

(c) între 220 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale apexului și ale curbei descendente a maximului dat de extractul de probă nu trebuie să difere între ele pentru zonele din spectru situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când abaterea între spectre nu depășește 15 % din absorbanța spectrului apexului punctului de maxim în nici un punct observat.

Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe aceeași probă nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul mai mare pentru conținuturile de olaquindox cuprinse între 10 și 20 mg/kg

7.3. *Recuperare*

Pentru o probă martor suplimentată, recuperarea trebuie să fie de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

A fost întreprins un studiu prin colaborare la nivelul Comunității Europene în care patru probe de hrană pentru purcei, inclusiv o probă martor din această hrană, au fost analizate de 13 laboratoare. Rezultatele sunt prezentate în continuare:

	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
medie (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
Conținut nominal (mg/kg)	–	15	50	100
recuperare (%)	–	97,3	96,0	95,4

L: număr de laboratoare

n: număr de valori individuale

S_r: abatere standard a repetabilității

S_R: abatere standard a reproductibilității

CV_r: coeficient de variație a repetabilității

CV_R: coeficient de variație a reproductibilității.

9. **Observație**

Cu toate că nu a fost validată metoda pentru tipurile de hrană care conțin peste 100 mg/kg de olaquindox, este posibil să se obțină rezultate satisfăcătoare prin folosirea unei probe cu o greutate mai mică și/sau prin diluarea extractului (5.2) pentru a atinge o concentrație situată în zona graficului de calibrare (5.3.2).