ΔΩΔΕΚΑΤΗ ΟΔΗΓΙΑ 93/117/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 17ης Δεκεμβρίου 1993

περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων αναλύσεως για τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών

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 τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3768/85 [2], και ιδίως το άρθρο 2,

Εκτιμώντας:

ότι η οδηγία 70/373/ΕΟΚ προβλέπει ότι ο επίσημος έλεγχος των ζωοτροφών, προκειμένου να διαπιστώνεται κατά πόσον 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 είναι σκόπιμο να προδιορίζεται κοινοτική μέθοδος ανάλυσης για την ανίχνευση των πρόσθετων ουσιών ροβενιδίνης και μεθυλ-μπενζοκουέιτ, προκειμένου να διαπιστώνεται κατά πόσον πληρούνται οι προϋποθέσεις για χρησιμοποίηση της εν λόγω ουσίας στις ζωοτροφές·

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 τον επίσημο έλεγχο των ζωοτροφών, όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε ροβενιδίνη και μεθυλ-μπενζοκουέιτ, πραγματοποιείται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα.

Άρθρο 2

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις για να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία το αργότερο στις 30 Νοεμβρίου 1994. Πληροφορούν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

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

Άρθρο 3

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

Βρυξέλλες, 17 Δεκεμβρίου 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

1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΟΒΕΝΙΔΙΝΗΣ

Υδροχλωρική 1,3-δις[(4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο] γουανιδίνη

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της ροβενιδίνης στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 5 mg/kg.

2. **Αρχή της μεθόδου**

Το δείγμα εκχυλίζεται με οξινισμένη μεθανόλη. Το εκχύλισμα ξηραίνεται και μέρος αυτού υποβάλλεται σε καθαρισμό πάνω σε στήλη οξειδίου του αργιλίου. Η ροβενιδίνη εκλούεται από τη στήλη με μεθανόλη και φέρεται στον κατάλληλο όγκο με κινητή φάση. Η περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη προσδιορίζεται με υψηλής αποδόσεως υγρή χρωματογραφία (HPLC) ανάστροφης φάσεως με τη βοήθεια ανιχνευτού υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. *Μεθανόλη*

3.2. *Οξινισμένη μεθανόλη*

Εντός βαθμονομημένης φιάλης των 500 ml εισάγονται 4,0 ml υδροχλωρικού οξέος (P_{20}, 1,18 g/ml περίπου), προστίθεται μεθανόλη (3.1) μέχρι τη χαραγή και το περιεχόμενο αναμειγνύεται. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευασθεί λίγο πριν χρησιμοποιηθεί.

3.3. *Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC*

3.4. *Μοριακό κόσκινο*

Σφαιρίδια τύπου 3A, 8-12 βρόχων (διάμετρος σφαιριδίων 1,6-2,5 mm, κρυσταλλικό πυριτικό αργίλιο, διάμετρος πόρων 0,3 nm)

3.5. *Οξείδιο του αργιλίου: όξινο, βαθμού ενεργότητας I για χρωματογραφία στήλης*

Εισάγουμε 100 g οξειδίου του αργιλίου σε κατάλληλο δοχείο και προσθέτουμε 2,0 ml ύδατος. Πωματίζουμε και ανακινούμε καλώς επί 20 λεπτά. Φυλάσσουμε το διάλυμα σε καλώς πωματισμένο δοχείο.

3.6. *Διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου, συγκεντρώσεως 0,025* mol/l

Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,40 g δισόξινου φωσφορικού καλίου εντός βαθμονομημένης φιάλης των 1000 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.7. *Διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου, συγκεντρώσεως 0,025* mol/l

Διαλύουμε σε νερό (καθαρότητας HPLC) 3,55 g άνυδρου (ή 4,45 g δις ένυδρου ή 8,95 g δωδεκάκις ένυδρου) μονόξινου φωσφορικού νατρίου εντός βαθμονομημένης φιάλη των 1000 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.8. *Κινητή φάση HPLC*

Αναμειγνύουμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

650 ml ακετονιτριλίου (3.3)

250 ml ύδατος (καθαρότητας HPLC)

50 ml διαλύματος δισόξινου φωσφορικού καλίου (3.6)

50 ml διαλύματος μονόξινου φωσφορικού νατρίου (3.7)

Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικής μεμβάνης πάχους 0,22 μm (4.6) και απομακρύνονται τα αέρια (π.χ. δι' εκθέσεως σε υπερήχους επί 10 λεπτά).

3.9. *Πρότυπη ουσία*

Καθαρή ροβενιδίνη: υδροχλωρική 1.3-δις [4-χλωροβενζυλιδενο)αμινο]γουανιδίνη, E 758

3.9.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 300 μg/ml

Ζυγίζουμε 30 mg της πρότυπης ουσίας (3.9) με ακρίβεια 0,1 mg. Διαλύουμε σε οξινισμένη μεθανόλη (3.2) εντός βαθμονομημένης φιάλης των 100 ml, Περιτυλίγουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.

3.9.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα ροβενιδίνης: 12 μg/ml

Μεταφέρουμε 10,0 ml του μητρικού πρότυπου διαλύματος (3.9.1) εντός βαθμολογημένης φιάλης των 250 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.8) και αναμειγνύουμε. Περιτυλίσσουμε τη φιάλη με αλουμινόχαρτο και τη φυλάσσουμε σε σκοτεινό μέρος.

3.9.3. Διαλύματα βαθμονόμησης

Μεταφέρουμε 5,0 ml 10,0 ml, 15,0 ml, 20,0 ml και 25,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.9.2) σε βαθμονομημένες φιάλες των 50 ml. Συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση (3.8) και αναμειγνύουμε. Η συγκέντωση των διαλυμάτων αυτών σε ροβενιδίνη είναι αντιστοίχως 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 και 6,0 μg/ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

4. **Συσκευές και όργανα**

4.1. *Υάλινη στήλη*

Υάλινη στήλη φαιοκίτρινου χρώματος (όπως το χρώμα του ηλέκτρου), εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με δεξαμενή χωρητικότητας 150 ml περίπου, εσωτερικής διαμέτρου 10-15 μμ και μήκους 250 μμ.

4.2. *Χειροκίνητος αναδευτήρας εργαστηρίου*

4.3. *Περιστροφικός εξατμιστήρας υμενίου*

4.4. *Συσκευή* HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με αντιστοιχία διόδιων ως ανιχνευτή η οποία να λειτουργεί στην περιοχή 250-400 nm

4.4.1. Στήλη υγρής χρωματογραφίας διαστάσεων 300 mm × 4 mm, με υλικό πληρώσεως C18 πάχους 10 μm ή άλλη δύναμη

4.5. *Διηθητικός χάρτης από ίνες υάλου* (Whatman GF/A ή άλλου ισοδύναμου τύπου)

4.6. *Διηθητικές μεμβράνες πάχους 0,22 μm*

4.7. *Διηθητικές μεμβράνες πάχους 0,45 μm*

5. **Διαδικασία**

Σημείωση: Η ροβενιδίνη παρουσιάζει ευαισθησία στο φως· γι' αυτό θα πρέπει σε όλες τις ενέργειες να χρησιμοποιούνται υάλινα σκεύη φαιοκίτρινου χρώματος.

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σ' αυτό ούτε ροβενιδίνη ούτε άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής (5.1.1) το οποίο θα έχει προηγουμένως εμπλουτιστεί με ποσότητα ροβονιδίνης παραπλήσια εκείνης του δείγματος. Για εμπλουτισμό μέχρι 60 mg/kg, μεταφέρουμε 3,0 ml του μητρικού προτύπου διαλύματος (3.9.1) σε κωνική φιάλη των 250 ml. Εξατμίζουμε το διάλυμα υπό ρεύμα αζώτου μέχρις ότου απομείνουν περί τα 0,5 ml. Προσθέτουμε 15 g του τυφλού δείγματος, αναμειγνύουμε και αναμένουμε επί 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στην εκχύλιση (5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς αυτής της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρομοίου τύπου προς εκείνον του δείγματος και κατά την ανάλυση δεν πρέπει να ανιχνεύεται ροβενιδίνη.

5.2. *Εκχύλιση*

Ζυγίζονται περί τα 15 g που παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,01 g, εισάγονται σε κωνική φιάλη των 250 ml όπου και προστίθενται 100,0 ml οξινισμένης μεθανόλης (3.2). Πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται επί μία ώρα με τον αναδευτήρα (4.2). Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη από ίνες υάλου (4.5) και το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 150 ml. Προστίθενται 7,5 g από μοριακό κόσκινο (3.4), πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται το περιεχόμενο επί 5 λεπτά. Το παρασκεύασμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη από υάλινες ίνες και το λαμβανόμενο διάλυμα φυλάσσεται για το στάδιο διαχωρισμού (5.3).

5.3. *Καθαρισμός*

5.3.1. Προετοιμασία της στήλης οξειδίου και αργιλίου

Μικρό βύσμα υαλοβάμβακος τοποθετείται στο κάτω μέρος μιας υάλινης στήλης (4.1) και συμπιέζεται με τη βοήθεια υάλινης ράβδου. Ζυγίζονται 11,0 g του παρασκευασθέντος οξειδίου του αργιλίου (3.5) και μεταφέρονται στη στήλη. Λαμβάνεται φροντίδα ώστε κατά το στάδιο αυτό η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα να περιορισθεί στο ελάχιστο. Χτυπάμε ελαφρά τη στήλη από στο κάτω μέρος της ώστε να κατακαθήσει το οξείδιο του αργιλίου.

5.3.2. Καθαρισμός του δείγματος

Με ένα σιφώνιο εισάγονται στη στήλη 5,0 ml από το εκχύλισμα που ελήφθη κατά το στάδιο 5.2. Φέρεται στο άκρο του σιφωνίου πλησίον του τοιχώματος της στήλης και το διάλυμα αφήνεται να απορροφηθεί από το οξείδιο του αργιλίου. Εκλούεται η ροβενιδίνη από τη στήλη με 100 ml μεθανόλης (3.1) σε ρυθμό ροής 2-3 ml/min και συλλέγεται το υγρό της έκλουσης σε σφαιρική φιάλη των 250 ml. Το διάλυμα μεθανόλης εξατμίζεται μέχρι πλήρους ξηράνσεως σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα υμενίου (4.3). Το υπόλειμμα διαλύεται εκ νέου σε 3-4 ml κινητής φάσεως (3.8) και μεταφέρεται ποσοτικώς σε βαθμονομημένη φιάλη των 10 ml. Η φιάλη εκπλύνεται επανειλημμένως με 1-2 ml κινητής φάσεως κάθε φορά και τα υπολείμματα των εκπλύσεων μεταφέρονται στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται ο ίδιος διαλύτης στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται ο ίδιος διαλύτης μέχρι τη χαραγή και το περιεχόμενο της φιάλης αναμειγνύεται. Μέρος του τελευταίου αυτού διαλύματος διηθείται μέσω μεμβράνης των 0,45 μμ (4.7) και φυλάσσεται για τον προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (5.4).

5.4. *Προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC*

5.4.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες είναι απλώς ενδεικτικές· ισοδύναμα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν και υπό άλλες συνθήκες.

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.4.1)

Κινητή φάση HPLC: (3.8)

Ρυθμός ροής: 1,5-2 ml/λεπτό

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 317 nm

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 20-50 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα της χρωματογραφικής διάταξης με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (3.9.3) συγκεντρώσεως 3,6 μg/ml έως ότου επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.4.2. Καμπύλη βαθμονόμησης

Εισάγεται κατ' επανάληψη καθένα από τα διαλύματα αναφοράς (3.9.3) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών (εμβαδά) για κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς με τεταγμένες τις μέσες του ύψους των κορυφών ή τις μέσες τιμές των εμβαδών και με τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.4.3. Διάλυμα δείγματος

Εισάγεται κατ' επανάληψη στη στήλη το εκχύλισμα του δείγματος (5.3.2) σε όγκο ίσο με εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) των κορυφών που αντιστοιχούν στη ροβενιδίνη.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του δείγματος σε μg/ml με βάση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της ροβενιδίνης του διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.4.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ροβενιδίνη (mg/kg) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

όπου:

c = συγκέντρωση της ροβενιδίνης στο διάλυμα του δείγματος, σε μg/ml

m = η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

7. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας*

Η ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή δια χρησιμοποιήσεως συστοιχίας διόδων ως ανιχνευτή δια του οποίου γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (3.9.3) συγκεντρώσεως 6,0 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα του δείγματος εμπλουτίζεται δια προσθήκης κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος αναφοράς (3.9.3). Η ποσότητα της προστιθέμενης ροβενιδίνης πρέπει να είναι παραπλήσια προς την κατ' εκτίμηση υπολογιζόμενη ποσότητα ροβενιδίνης στο εκχύλισμα του δείγματος.

Αν συνεκτιμηθούν τόσο η ποσότητα που προστέθηκε όσο και η αραίωση του εκχυλίσματος, θα πρέπει να σημειωθεί ενίσχυση μόνον της κορυφής που αντιστοιχεί στη ροβενιδίνη. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ περίπου του μεγίστου ύψους αυτής πρέπει να κυμαίνεται κατά 10 % περίπου σε σχέση με το αρχικό εύρος.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχία διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα του δείγματος και στο φάσμα του προτύπου και τα οποία αντιστοιχούν στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα πρέπει να είναι τα ίδια, με μια διαφορά της οποίας τα όρια καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα της ανιχνευτικής διάταξης. Για ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό είναι ± 2 nm.

β) Μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα τμήματα εκείνα 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 η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορόφησης της πρότυπης ανιχνευόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 250 και 400 nm, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα, στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν το ένα από το άλλο για τα τμήματα εκείνα 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 η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος.

Εάν έστω και ένα από τα ανωτέρω κριτήρια δεν πληρούνται, τότε η παρουσία της ανιχνευόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωθείσα

7.2. *Επαναληπτικότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων ποσοτικών προσδιορισμών επί του ιδίου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του αποτελέσματος με την υψηλότερη τιμή, για περιεκτικότητα σε ροβενιδίνη μεγαλύτερη από 15 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

Για ένα εμπλουτισμένο τυφλό δείγμα, η ανάκτηση πρέπει να είναι τουλάχιστον 85 %.

8. **Αποτελέσματα συλλογικής μελέτης**

Διοργανώθηκε από την Κοινότητα η πραγματοποίηση συλλογικής μελέτης κατά την οποία αναλύθηκαν 4 δείγματα ζωοτροφών για πουλερικά και κουνέλια, υπό τη μορφή αλεύρων ή μορφή συμπήκτων. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 12 εργαστήρια και κάθε δείγμα αναλύθηκε δύο φορές. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων είναι τα ακόλουθα:

	Πουλερικά		Κουνέλια	
	Κουνέλια	Πουλερικά	Άλευρα	Καταπότια
Μέσος όρος mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_r (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Ανάκτηση (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

Σ_p = Τυπική απόκλιση επαναληπτικότητας
CV_r = Συντελεστής μεταβολής της επαναληπτιμότητας
S_R = Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας
CV_R = Συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγικότητας

2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΜΕΘΥΛ-ΜΠΕΝΖΟΚΟΥΕΙΤ

7-βενζυλοξη-6-βουτυλ-3-μεθοξυκαρβονυλ-4-κινολόνη

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της ουσίας μεθυλμπενζοκουέιτ στις ζωοτροφές. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 1 mg/kg.

2. **Αρχή της μεθόδου**

Η ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ λαμβάνεται από το δείγμα δι' εκχυλίσεως με μεθανολικό διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος. Το εκχύλισμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με διχλωρομεθάνιο δι' ιοντοεναλλακτικής χρωματογραφίας και εν συνεχεία πάλι με διχλωρομεθάνιο. Η περιεκτικότητα σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ προσδιορίζεται με υψηλής αποδόσεως υγρή χρωματογραφία (HPLC) ανάστροφης φάσεως με τη βοήθεια ανιχνευτού υπεριώδους ακτινοβολίας.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. *Διχλωρομεθάνιο*

3.2. *Μεθανόλη καθαρότητας* HPLC

3.3. *Κινητή φάση* HPLC

Μείγμα μεθανόλης (3.2) και ύδατος (καθαρότητας HPLC) σε αναλογία όγκων 75 και 25.

Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο πάχους 0,22 μm (4.5) και αφαιρούνται τα αέρια (π.χ. δι' εκθέσεως σε υπερήχους επί 10 λεπτά).

3.4. *Διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος* σ = 2 %

Διαλύονται 20,0 ml μεθανοσουλφονικού οξέος σε 1 000 ml μαθανόλης (3.2).

3.5. *Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος* σ = 10 %

Διαλύονται 100 ml υδροχλωρικού οξέος (ρ_{20} = 1,18 g/ml περίπου) σε 1 000 ml ύδατος.

3.6. *Ιοντοεναλλακτική ρητίνη κατιόντων Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh*

Η ρητίνη υποβάλλεται σε προκαταρκτική επεξεργασία: αναμειγνύονται 100 γραμμάρια ρητίνης με 500 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5) και θερμαίνονται μέχρι βρασμού πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα υπό συνεχή ανάδευση. Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει και αποχύνεται το οξύ. Διηθούμε μέσω διηθητικού χάρτη υπό κενό. Εκπλύνουμε τη ρητίνη δύο φορές με 500 ml ύδατος κάθε φορά και εν συνεχεία με 250 ml μεθανόλης (3.2). Εκπλύνουμε τη ρητίνη μια ακόμη φορά με 250 ml μεθανόλης και ξηραίνουμε δια διαβιβάσεως αέρος μέσω του στερεού υπολείμματος της διήθησης. Η αποξηραμένη ρητίνη φυλάσσεται σε πωματισμένη φιάλη.

3.7. *Πρότυπη ουσία: καθαρή μεθυλ-μπενζοκουέιτ (7-βενζυλοξη-6-βουτυλ-3-μεθοξυκαρβονυλ-4-κινολόνη)*

3.7.1. Μητρικό πρότυπο διάλυμα της ουσίας μεθυλ-μπενζοκουέιτ, 500 μg/ml

Ζυγίζουμε 50 mg της πρότυπης ουσίας (3.7) με ακρίβεια 0,1 mg, διαλύονται σε διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) μέσα σε βαθμονομημένη φιάλη των 100 ml, συμπληρώνουμε μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.7.2. Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα της ουσίας μεθυλ-μπενζοκουέιτ, 50 μg/ml

Μεταφέρουμε 5,0 ml του μητρικού πρότυπου διαλύματος μεθυλ-μπενζοκουέιτ (3.7.1) σε βαθμονομημένη φιάλη των 50 ml, συμπληρώνουμε με μεθανόλη (3.2) μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε.

3.7.3. Διαλύματα αναφοράς

Μεταφέρουμε 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml και 5,0 ml του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος μεθυλ-μπενζοκουέιτ (3.7.2) σε βαθμολογημένες φιάλες των 25 ml. Συμπληρώνουμε με την κινητή φάση (3.3) μέχρι τη χαραγή και αναμειγνύουμε. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων αυτών σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ είναι αντιστοίχως 2,0 μg/ml, 4,0μg/ml, 6,0μg/ml, 8,0μg/ml και 10,0 μg/ml. Τα διαλύματα αυτά πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

4. **Συσκευές και όργανα**

4.1. *Αναδευτήρας εργαστηρίου*

4.2. *Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας υμενίου*

4.3. *Υάλινη στήλη (250 mm × 15 mm), εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με δεξαμενή χωρητικότητας 200 ml περίπου*

4.4. *Συσκευή HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας μεταβλητού μήκους κύματος ή με συστοιχία διόδων ως ανιχνευτή*

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

4.5. *Διηθητικές μεμβράνες 0,22 μm*

4.6. *Διηθητικές μεμβράνες 0,45 μm*

5. **Διαδικασία**

5.1. *Γενικά*

5.1.1. Πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής για να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει σ' αυτό ούτε η ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ ούτε άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες.

5.1.2. Για να εξακριβωθεί ο βαθμός ανάκτησης, πρέπει να αναλυθεί τυφλό δείγμα ζωοτροφής το οποίο θα έχει εμπλουτιστεί με προσθήκη ποσότητας μεθυλ-μπενζοκουέιτ παραπλήσιας εκείνης του δείγματος. Για εμπλουτισμό μέχρι 15 mg/kg, προσθέτουμε 600 μl του μητρικού πρότυπου διαλύματος (3.7.1) σε 20 g του τυφλού δείγματος ζωοτροφής, αναμειγνύουμε και περιμένουμε επί 10 λεπτά πριν προχωρήσουμε στο στάδιο της εκχύλισης (5.2).

Σημείωση: Για τους σκοπούς της μεθόδου, το τυφλό δείγμα ζωοτροφής πρέπει να είναι παρόμοιο τύπου προς εκείνον του δείγματος και κατά την ανάλυση δεν πρέπει να ανιχνεύεται μεθυλ-μπενζοκουέιτ.

5.2. *Εκχύλιση*

Ζυγίζονται περί τα 20 g του παρασκευασθέντος δείγματος με ακρίβεια 0,01 g και εισάγονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Προστίθενται 100,0 ml του διαλύματος μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) και ακολουθεί μηχανική ανατάραξη (4.1) επί 30 λεπτά. Το διάλυμα διηθείται μέσω διηθητικού χάρτη και το διήθημα φυλάσσεται για το στάδιο διαχωρισμού υγρού-υγρού (5.3).

5.3. *Διαχωρισμός υγρού-υγρού*

Εντός διαχωριστικής χοάνης των 500 ml όπου περιέχονται 100 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5), εισάγονται 25,0 ml του διηθήματος που ελήφθη κατά το στάδιο (5.2). Προστίθενται στη χοάνη 100 ml διχλωρομεθανίου (3.1) και ακολουθεί ανατάραξη επί 1 λεπτό. Αφήνεται να επέλθει διαχωρισμός των στοιβάδων και αποχύνεται η υποκείμενη στοιβάδα (διχλωρομεθάνιο) εντός σφαιρικής φιάλης με σφαιρικό πυθμένα και όγκου 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της υδατικής φάσεως με δύο ακόμη ποσότητες διχλωρομεθανίου των 40 ml και τα εκχυλίσματα εισάγονται στη σφαιρική φιάλη μαζί με το πρώτο εκχύλισμα. Το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου αφήνεται να εξατμισθεί μέχρι πλήρους ξηράνσεως στον περιστροφικό εξατμιστήρα (4.2), σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 20-25 ml μεθανόλης (3.2), πωματίζεται η φιάλη και φυλάσσεται το σύνολο του εκχυλίσματος για το στάδιο της ιοντοεναλλακτικής χρωματογραφίας (5.4).

5.4. *Ιοντοεναλλακτική χρωματογραφία*

5.4.1. Προετοιμασία της στήλης ανταλλαγής κατιόντων

Τοποθετείται βύσμα υαλοβάμβακος στο κάτω μέρος μιας υάλινης στήλης (4.3). Παρασκευάζεται μείγμα 5,0 g της προεπεξεργασμένης ρητίνης ανταλλαγής κατιόντων (3.6) με 50 ml υδροχλωρικού οξέος (3.5), εισάγεται στην υάλινη στήλη και αφήνεται να ηρεμήσει. Απορρίπτεται το πλεονάζον οξύ μέχρις ότου η στάθμη του φθάσει ακριβώς πάνω από την επιφάνεια της ρητίνης και η στήλη εκπλύνεται με νερό μέχρις ουδετέρας αντιδράσεως του εκρέοντος υγρού με το χάρτη του ηλιοτροπίου. Εισάγονται πάνω στη στήλη 50 ml μεθανόλης (3.2) και αφήνονται να φθάσουν μέχρι την επιφάνεια της ρητίνης.

5.4.2. Χρωματογραφία στήλης

Με ένα σιφώνιο εισάγεται προσεκτικά πάνω στη στήλη το εκχύλισμα που ελήφθη κατά το στάδιο (5.3). Εκπλύνεται η σφαιρική φιάλη με δύο ποσότητες μεθανόλης (3.2) των 5-10 ml και τα υπολείμματα της έκπλυσης μεταφέρονται στη στήλη. Αφήνεται το εκχύλισμα να ρεύσει μέχρι την επιφάνεια της ρητίνης και εκπλύνεται η στήλη με 50 ml μεθανόλης κατά τρόπον ώστε ο ρυθμός της ροής να μην υπερβαίνει τα 5 ml/min ανά λεπτό. Το εκρέον υγρό απορρίπτεται. Εκλούεται η μεθυλ-μπενζοκουέιτ από τη στήλη δια χρησιμοποιήσεως 150 ml διαλύματος μεθανοσουλφονικού οξέος (3.4) και το υγρό της έκλουσης συλλέγεται από τη στήλη μέσα σε κωνική φιάλη των 250 ml.

5.5. *Διαχωρισμός υγρού-υγρού*

Εισάγεται το υγρό της έκλουσης το οποίο ελήφθη κατά το στάδιο (5.4.2) εντός διαχωριστικής χοάνης του 1 λίτρου. Εκπλύνεται η κωνική φιάλη με 5-10 ml μεθανόλης (3.2) και τα υπολείμματα της έκλουσης αναμειγνύονται με το περιεχόμενο της διαχωριστικής χοάνης. Προστίθενται 300 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (3.5) και 130 ml διχλωρομεθανίου (3.1). Ακολουθεί ανατάραξη επί 1 λεπτό και αφήνεται να επέλθει διαχωρισμός των φάσεων. Αποχύνεται η κατώτερη στοιβάδα (διχλωρομεθάνιο) εντός σφαιρικής φιάλης με σφαιρικό πυθμένα και όγκου 500 ml. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση της υδατικής φάσεως με δύο επιπλέον ποσότητες διχλωρομεθανίου των 70 ml και τα εκχυλίσματα εισάγονται μαζί με το πρώτο στη σφαιρική φιάλη.

Αφήνεται να εξατμιστεί το εκχύλισμα του διχλωρομεθανίου μέχρι πλήρους ξηράνσεως στον περιστροφικό εξατμιστήρα (4.2) σε θερμοκρασία 40 °C και υπό ελαττωμένη πίεση. Διαλύεται το υπόλειμμα της φιάλης με περίπου 5 ml μεθανόλης (3.2) και το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά σε βαθμονομημένη φιάλη των 10 ml. Εκπλύνεται η σφαιρική φιάλη με δύο ακόμη ποσότητες μεθανόλης 1-2 ml και τα υπολείμματα της έκπλυσης μεταφέρονται στη βαθμονομημένη φιάλη. Προστίθεται μεθανόλη μέχρι τη χαραγή και ακολουθεί ανάμειξη. Μέρος του εν λόγω υγρού διηθείται μέσω διηθητικής μεμβράνης (4.6). Το εν λόγω διάλυμα φυλάσσεται για τον προσδιορισμό με χρωματογραφία HPLC (5.6).

5.6. *Προσδιορισμός με χρωματογραφία HPLC*

5.6.1. Παράμετροι

Οι ακόλουθες πειραματικές συνθήκες είναι απλώς ενδεικτικές· ισοδύναμα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν και υπό άλλες συνθήκες.

Στήλη υγρής χρωματογραφίας (4.4.1)

Κινητή φάση HPLC: Μείγμα μεθανόλης-ύδατος (3.3)

Ρυθμός ροής: 1 — 1,5 ml/λεπτό

Μήκος κύματος ανίχνευσης: 265 nm

Όγκος εισαγόμενου δείγματος: 20 — 50 μl.

Ελέγχεται η σταθερότητα της χρωματογραφικής διάταξης με επανειλημμένη εισαγωγή του διαλύματος αναφοράς (3.7.3) συγκεντρώσεως 4,0 μg/ml έως ότου επιτευχθούν σταθερά ύψη κορυφών ή εμβαδά και σταθεροί χρόνοι κατακράτησης.

5.6.2. Καμπύλη αναφοράς

Εισάγονται κατ' επανάληψη καθένα από τα διαλύματα αναφοράς (3.7.3) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών (εμβαδά) για κάθε συγκέντρωση. Χαράσσεται η καμπύλη αναφοράς με τεταγμένες τις μέσες τιμές του ύψους των κορυφών ή τις μέσες τιμές των εμβαδών και με τετμημένες τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε μg/ml.

5.6.3. Διάλυμα δείγματος

Εισάγεται κατ' επανάληψη στη στήλη το εκχύλισμα του δείγματος (5.5) σε όγκο ίσο με εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για τα διαλύματα αναφοράς και προσδιορίζεται το μέσο ύψος κορυφής (εμβαδόν) των κορυφών που αντιστοιχούν στην ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ.

6. **Υπολογισμός των αποτελεσμάτων**

Προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος του δείγματος σε μg/ml με βάση το μέσο ύψος (εμβαδόν) των κορυφών της μεθυλ-μπενζοκουέιτ του διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς (5.6.2).

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε μεθυλ-μπενζοκουέιτ (mg/kg) υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = η συγκέντρωση της μεθυλ-μπενζοκουέιτ στο διάλυμα του δείγματος, σε μg/ml και

m = η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

7. **Επαλήθευση των αποτελεσμάτων**

7.1. *Ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας*

Η ταυτότητα της ανιχνευόμενης ουσίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με συγχρωματογραφία ή δια χρησιμοποιήσεως συστοιχίας διόδων ως ανιχνευτή δια του οποίου γίνεται σύγκριση των φασμάτων του εκχυλίσματος του δείγματος και του διαλύματος αναφοράς (3.7.3) συγκεντρώσεως 10 μg/ml.

7.1.1. Συγχρωματογραφία

Εκχύλισμα του δείγματος εμπλουτίζεται δια προσθήκης κατάλληλης ποσότητας του ενδιάμεσου πρότυπου διαλύματος (3.7.2). Η ποσότητα της προστιθέμενης μεθυλ-μπενζοκουέιτ πρέπει να είναι παραπλήσια προς την κατ' εκτίμηση υπολογιζόμενη ποσότητα μεθυλ-μπενζοκουέιτ στο εκχύλισμα του δείγματος. Αν συνεκτιμηθούν τόσο η ποσότητα που προστέθηκε όσο και η αραίωση του εκχυλίσματος, θα πρέπει να σημειωθεί ενίσχυση μόνον της κορυφής που αντιστοιχεί στην ουσία μεθυλ-μπενζοκουέιτ. Το εύρος της κορυφής στο ήμισυ περίπου του μεγίστου ύψους αυτής πρέπει να κυμαίνεται κατά 10 % περίπου σε σχέση με το αρχικό εύρος.

7.1.2. Ανίχνευση με συστοιχεία διόδων

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

α) Τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση στο φάσμα του δείγματος και στο φάσμα του προτύπου και τα οποία αντιστοιχούν στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, πρέπει να είναι τα ίδια, με μια διαφορά της οποίας τα όρια καθορίζονται από τη διαχωριστική ικανότητα της ανιχνευτικής διάταξης. Για ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό είναι ± 2 nm.

β) Μεταξύ 220 και 350 nm, τα φάσματα του δείγματος και του προτύπου, καταγραφόμενα στο μέγιστο ύψος των κορυφών στο χρωματογράφημα, δεν πρέπει να διαφέρουν για τα τμήματα εκείνα 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 η απόκλιση μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15 % απορρόφησης της πρότυπης ανιχνευόμενης ουσίας.

γ) Μεταξύ 220 και 350 nm νανομέτρων, τα φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα, στο μέγιστο ύψος και στο κατερχόμενο τμήμα της κορυφής του εκχυλίσματος του δείγματος δεν πρέπει να διαφέρουν το ένα από το άλλο για τα τμήματα εκείνα 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 η απόκλιση μεταξύ των φασμάτων δεν υπερβαίνει το 15% της απορρόφησης του φάσματος στο μέγιστο ύψος.

Εάν έστω και ένα από τα ανωτέρω κριτήρια δεν πληρούται, τότε η παρουσία της ανιχνευόμενης ουσίας δεν θεωρείται επιβεβαιωθείσα.

7.2. *Επαναληπτικότητα*

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων ποσοτικών προσδιορισμών επί του ιδίου δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του αποτελέσματος με την υψηλότερη τιμή για περιεκτικότητα της μεθυλ-μπενζοκουέιτ μεταξύ 4 και 20 mg/kg.

7.3. *Ανάκτηση*

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

8. **Αποτελέσματα συλλογικής μελέτης**

Αναλύθηκαν πέντε δείγματα σε δέκα εργαστήρια και κάθε δείγμα αναλύθηκε δύο φορές.

Αποτελέσματα

	Τυφλό δείγμα	Σιτηρέσιον 1	Καταπότιον 1	Σιτηρέσιον 2	Καταπότιον 2
Μέσος όρος (mg/kg)	δεν ανιχνεύθηκε	4,50	4,50	8,90	8,70
S_r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S_R (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
ανάκτηση (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

S_r = Τυπική απόκλιση επαναληπτικότητας

CV_r = Συντελεστής μεταβολής της επαναληπτικότητας

S_R = Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας

CV_R = Συντελεστής μεταβολής της αναπαραγωγιμότητας