



GUVERNUL REPUBLICII MOLDOVA

HOTĂRÂRE nr. _____

din _____ 2025

Chișinău

**privind modificarea Hotărârii Guvernului nr. 686/2012 cu privire la
aprobarea metodelor de analiză pentru controlul nutrețurilor**

Guvernul HOTĂRĂȘTE:

Prezenta hotărâre transpune Regulamentul (CE) nr. 152/2009 al Comisiei din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor, CELEX: 32009R0152, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene seria L nr. 54 din 26 februarie 2009 așa cum a fost ultima dată modificat.

1. Hotărârea Guvernului nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor (Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2012, nr. 198-204 art. 741), cu modificările ulterioare, se modifică după cum urmează:

1.1. în hotărâre:

1.1.1 în denumire și pe tot parcursul textul, textul „controlul nutrețurilor” la orice formă gramaticală se substituie cu cuvintele „controlul oficial al furajelor” la forma gramaticală corespunzătoare.

1.2. punctul 1, se substituie și va avea următorul cuprins:

“ Metodele de eșantionare pentru controlul oficial al furajelor, în vederea determinării constituenților, inclusiv materialelor care conțin, constau sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), a aditivilor pentru hrana animalelor, a substanțelor nedorite și a reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin

Hotărârea Guvernului nr.910/2020, conform anexei nr. 1, cu excepția eșantionării pentru controlul contaminării microbiologice.

Metoda de eșantionare stabilită în anexa nr.1 se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite în Regulamentul sanitar privind limitele maxime de reziduuri de pesticide din sau de pe produse alimentare și hrană de origine vegetală și animală pentru animale, aprobate prin Hotărârii Guvernului nr. 867/2023.

Metodele de preparare a eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor, conform anexei nr. 2;

Metodele de analiză privind controlul compoziției materiilor prime pentru furaje și a furajelor combinate, conform anexei nr. 3

Metodele de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje, conform anexei nr. 4;

Metodele de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje, conform anexei nr. 5;

Metodele de analiză privind determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor, conform anexei nr.6 ;

Metodele de determinare a valorii energetice a furajelor combinate pentru păsările de crescătorie, conform anexei nr. 7.”

2. Anexele la hotărâre se substituie și se completează cu 7 anexe cu următorul cuprins:.

Anexă nr.1
la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

METODE DE EȘANTIONARE

1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE

Eșantioanele destinate controlului oficial al furajelor se prelevează în conformitate cu metodele descrise în continuare. Eșantioanele astfel prelevate se consideră reprezentative pentru loturile eșantionate.

Scopul eşantionării reprezentative este de a obține o mică fracțiune dintr-un lot în așa fel încât determinarea oricărei caracteristici speciale a acestei fracțiuni va reprezenta valoarea medie a caracteristicii lotului. Lotul se eşantionează prin prelevarea în mod repetat de eşantioane elementare, la diferite poziții unice din lot. Aceste eşantioane elementare sunt combinate prin amestecare pentru a forma un eşantion agregat pornind de la care sunt pregătite eşantioane finale reprezentative prin divizare reprezentativă.

În cazul în care, printr-o inspecție vizuală sau pe baza altor informații relevante, porțiuni din furajele care urmează să fie eşantionate arată o diferență de calitate față de restul furajelor din același lot, aceste fragmente se separă de restul de furaje și se tratează ca sublot separat. În cazul în care nu este posibilă separarea furajului în subloturi separate, el se eşantionează ca un singur lot. În astfel de cazuri, se menționează acest fapt în raportul de eşantionare.

În cazul în care un furaj eşantionat în conformitate cu dispozițiile prezentei hotărâri este identificat ca neîndeplinind cerințele ei și face parte dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele din prezenta anexă.

Eşantionarea poate include, de asemenea, furajele oferite spre vânzare de către operatorii din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță în conformitate cu pct.22 la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârile Guvernului nr.910/2020. Eşantionarea furajelor oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță face, în principiu, obiectul punctelor prevăzute în prezenta anexă. Aspectele specifice ale eşantionării în cazul eşantioanelor din vânzare la distanță sunt descrise la punctul 11.

2. DEFINIȚII

Lot - o cantitate identificabilă de furaj având anumite caracteristici comune confirmate, precum originea, varietatea, tipul ambalajului, ambalatorul, expeditorul sau etichetarea și, în cazul unui proces de producție, o unitate de producție provenind dintr-o singură instalație care utilizează parametri de producție uniformi sau mai multe astfel de unități, dacă sunt produse în mod continuu și depozitate împreună.

Lot eşantionat - un lot sau o parte identificată din lot sau sublot.

Eșantion sigilat - un eșantion sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul.

Eșantion elementar - o cantitate prelevată dintr-un punct al lotului eșantionat.

Eșantion agregat - o combinație de eșantioane elementare prelevate din același lot eșantionat.

Eșantion redus - o parte dintr-un eșantion agregat, obținută din acesta printr-un proces de reducere reprezentativă.

Eșantion final - o parte din eșantionul agregat (amestecat), din eșantionul redus sau din eșantionul agregat omogenizat, în funcție de tipul de control (a se vedea punctul 9.4).

Eșantion de laborator - un eșantion destinat laboratorului (astfel cum este primit de laborator) și care poate fi eșantionul final, redus sau agregat.

Eșantion din vânzare la distanță - un eșantion dintr-un lot de furaje oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță.

3. DISPOZIȚII GENERALE

Eșantioanele se prelevează de către personal autorizat în acest sens de către autoritatea competentă.

Pentru un eșantion din vânzare la distanță, o cantitate de furaj este solicitată operatorului din sectorul hranei pentru animale de către autoritatea competentă prin mijloace de comunicare la distanță.

Eșantionul trebuie să fie sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul.

Marcajul sigiliului trebuie să poată fi identificat în mod clar și vizibil.

Identificarea eșantionului: eșantionul trebuie să poarte un marcaj de neșters și trebuie să fie identificat astfel încât să existe o legătură lipsită de ambiguitate cu raportul de eșantionare.

Din fiecare eșantion agregat sau redus se prelevează următoarele eșantioane finale: unul pentru control (asigurarea respectării legislației) și unul pentru operatorul din sectorul hranei pentru animale (apărare). În final, poate fi prelevat încă un eșantion final pentru referință. În cazul în care eșantionul agregat complet se omogenizează, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat,

cu excepția cazului în care această procedură este contrară reglementărilor în ceea ce privește dreptul operatorului din sectorul hranei pentru animale.

În conformitate cu art. 15 alin. (1) și (2) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, atunci când acest lucru este necesar pentru efectuarea eșantionării oficiale, operatorii din sectorul hranei pentru animale, la cererea autorităților competente:

- acordă personalului autorităților competente acces la echipamentele aflate sub controlul lor, inclusiv, atunci când este necesar, pun la dispoziție echipament adecvat de eșantionare și echipamentul individual de protecție;
- acordă asistență personalului autorităților competente și cooperează cu acesta pentru a permite eșantionarea, inclusiv punerea la dispoziția personalului autorităților competente a furajelor.

4. APARATURA

4.1. Aparatura de prelevare de eșantioane trebuie să fie realizată din materiale care nu contaminatează produsele de eșantionat. Aparatura care este destinată a fi utilizată de mai multe ori trebuie să fie ușor de curățat pentru a evita contaminarea încrucișată.

4.2. Aparatura recomandată pentru prelevarea eșantioanelor din furaje solide

4.2.1. Prelevarea manuală

4.2.1.1. Lopată plată cu margini verticale.

4.2.1.2. Sondă de eșantionare cu o fantă lungă sau compartimentată. Dimensiunile sondei de eșantionare trebuie să fie adecvate caracteristicilor lotului eșantionat (adâncimea recipientului, dimensiunile sacului etc.) și dimensiunilor particulelor furajului.

4.2.1.3 În cazul în care sonda de eșantionare are mai multe orificii, pentru a se asigura faptul că eșantionul este prelevat în diferite locuri de-a lungul sondei, orificiile ar trebui să fie separate prin compartimente sau orificii eșalonate secvențial.

4.2.2. Prelevarea mecanică

Pentru prelevarea de eșantioane din furajele în mișcare poate fi utilizată aparatură mecanică adecvată. Aparatul mecanic este considerat adecvat dacă cel puțin întreaga secțiune a fluxului este eșantionată.

Prelevarea de eşantioane din furajele în mişcare (la rate de debit ridicat) poate fi efectuată de prelevatoare automate.

4.2.3. *Separator*

În cazul în care acest lucru este posibil şi oportun, aparatura destinată divizării eşantionului în părţi aproximativ egale trebuie să fie utilizată pentru prepararea eşantioanelor reduse în mod reprezentativ.

5. CERINŢE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEŞTE NUMĂRUL DE EŞANTIOANE ELEMENTARE

— Cerinţele cantitative la punctele 5.1 şi 5.2 în ceea ce priveşte numărul de eşantioane elementare sunt aplicabile pentru loturile eşantionate cu dimensiuni de până la maximum 500 de tone şi care pot fi eşantionate în mod reprezentativ. Procedura de eşantionare descrisă este, de asemenea, valabilă pentru cantităţi mai mari decât dimensiunea maximă a lotului eşantionat cu condiţia ca numărul maxim de eşantioane elementare indicate în următoarele tabele la punctele 5.1.1, 5.1.3 şi 5.1.5 să fie ignorată, numărul de eşantioane elementare fiind determinat prin formula cu rădăcina pătrată prevăzută în partea corespunzătoare a procedurii (a se vedea punctul 5.3) şi dimensiunea minimă a eşantionului agregat să fi crescut proporţional. Acest lucru nu împiedică împărţirea unui lot mare în subloturi mai mici şi eşantionarea fiecărui sublot în conformitate cu procedura descrisă la punctele 5.1 şi 5.2.

— Dimensiunea lotului eşantionat trebuie să permită eşantionarea fiecăreia dintre părţile sale constituate.

— Pentru loturile sau subloturile foarte mari (> 500 de tone) şi pentru loturile care sunt transportate sau depozitate în aşa fel încât eşantionarea nu poate fi efectuată în conformitate cu procedura de eşantionare prevăzută la punctele 5.1 şi 5.2 de la prezentul punct, trebuie aplicată procedura de eşantionare prevăzută la punctul 5.3.

— În cazul eşantioanelor din vânzările la distanţă, de obicei autoritatea competentă nu cunoaşte dimensiunea lotului din care se solicită cantitatea. Prin urmare, procedura menţionată la punctele 5.1 şi 5.2 nu poate fi utilizată. În acest caz, se aplică procedura descrisă la punctul 11.

— În cazul în care legislaţia impune operatorului din sectorul hranei pentru animale să se conformeze prezentei anexe în cadrul unui sistem de monitorizare obligatorie, operatorul din sectorul hranei pentru animale se poate abate de la cerinţele cantitative

prevăzute la prezentul punct pentru a lua în considerare caracteristicile operaționale, cu condiția ca el să fi demonstrat, într-un mod satisfăcător pentru autoritatea competentă, echivalența procedurii de eșantionare în ceea ce privește reprezentativitatea și după autorizarea din partea autorității competente.

— În cazuri excepționale, dacă nu este posibil să se aplice metoda de eșantionare prevăzută în ceea ce privește cerințele cantitative din cauza unei deteriorări comerciale inacceptabile a lotului (din cauza formelor ambalajului, a mijlocului de transport, a modului de depozitare etc.), se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare cu condiția ca aceasta să fie cât mai reprezentativă posibil și să fie descrisă și documentată integral.

5.1. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje.

5.1.1. Furaje vrac solide

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
$\leq 2,5$ tone	7
$> 2,5$ tone	$\sqrt{}$ (20 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) ^(*) , până la 40 de eșantioane elementare
(*) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	

5.1.2. Furaje vrac lichide

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
$\leq 2,5$ tone sau $\leq 2\,500$ de litri	4 ^(*)
$> 2,5$ tone sau $> 2\,500$ de litri	7 ^(*)
(*) În cazul în care nu este posibil să se obțină omogenizarea lichidului, numărul de eșantioane elementare trebuie mărit.	

5.1.3. Furaje ambalate

Furajele (solide și lichide) pot fi ambalate în pungi, saci, cutii de metal, cuve etc. care sunt menționate în următorul tabel ca unități. Unitățile mari (≥ 500 kg sau litri) trebuie să fie eșantionate în conformitate cu dispozițiile prevăzute pentru furaje vrac (a se vedea punctele 5.1.1 și 5.1.2)

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de unități din care trebuie prelevat (cel puțin) un eșantion elementar ^(*)
1 -20 de unități	1 unitate ^(*)
21 -150 de unități	3 unități ^(*)
151 -400 de unități	5 unități ^(*)
> 400 de unități	$\frac{1}{4}$ din $\sqrt{\text{numărul de unități care compun lotul eșantionat}}$ ^(*) , până la 40 de unități
(*) În cazul în care deschiderea unei unități ar putea afecta analiza (de exemplu, în cazul furajelor umede perisabile), un eșantion elementar va fi reprezentat de unitatea nedeschisă. (*) Pentru unitățile al căror conținut nu depășește 1 kg sau un litru, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originale. (*) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	

5.1.4. Blocuri de furaje și brichete minerale

Minimum un bloc sau o brichetă trebuie eșantionat(ă) per lot eșantionat de 25 de unități, până la un maximum de patru blocuri sau brichete.

În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.

5.1.5. Furaje grosiere/nutreț

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare ^(*)

≤ 5 tone	5
> 5 tone	$\sqrt{}$ (5 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) ^{(*)2} , până la 40 de eșantioane elementare
(^{*1}) Este recunoscut faptul că în anumite situații (de exemplu, furaje însilozate) nu este posibil să se preleveze eșantioanele elementare necesare, fără a cauza daune inacceptabile pentru lot. În astfel de situații se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare, iar un ghid pentru eșantionarea unor astfel de loturi a fost elaborat și este disponibil la următorul link https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf (^{*2}) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	

5.2. *Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje*

Aceste cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare trebuie utilizate în următoarele situații:

- controlul aflatoxinelor, al cornului-secarei, al altor micotoxine și impurități botanice dăunătoare în materiile prime furajere;
- controlul contaminării încrucișate printr-un constituent, inclusiv material MG, sau substanță pentru care este preconizată o distribuție neuniformă în furaje.

În cazul în care autoritatea de control are serioase suspiciuni privind apariția unei astfel de distribuții neuniforme și în cazul unei contaminări încrucișate printr-un constituent sau printr-o substanță într-un furaj combinat, se pot aplica cerințele cantitative, astfel cum sunt prevăzute în următorul tabel.

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
< 80 de tone	A se vedea cerințe cantitative de la punctul 5.1. Numărul de eșantioane elementare care trebuie prelevate trebuie să fie înmulțit cu 2,5.

≥ 80 de tone	100

5.3. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare în cazul loturilor de dimensiuni foarte mari

În cazul loturilor mari eșantionate (loturi eșantionate > 500 de tone), numărul de eșantioane elementare care trebuie prelevate = 40 de eșantioane elementare + $\sqrt{\text{tone}}$ în ceea ce privește controlul substanțelor sau produselor distribuite uniform în masa de furaje sau 100 de eșantioane elementare + $\sqrt{\text{tone}}$ în ceea ce privește controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în furaje.

6. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIONUL AGREGAT

Este necesar un singur eșantion agregat per lot eșantionat.

	Natura furajelor	Dimensiunea minimă a eșantionului agregat ^(*) ^(*)
6.1.	Furaje vrac	4 kg
6.2.	Furaje ambalate:	4 kg ^(*)
6.3.	Furaje lichide sau semilichide:	4 litri
6.4.	Blocuri de furaje sau brichete minerale:	
6.4.1.	cântărind mai mult de 1 kg fiecare	4 kg
6.4.2.	cântărind cel mult 1 kg fiecare	greutatea a patru blocuri sau brichete originale
6.5.	Furaje groșiere/nutreț	4 kg ^(*)

(*) În cazul în furajele eșantionate au o valoare ridicată, se prelevează o cantitate mai mică de eșantion agregat cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.

(*) În conformitate cu metodele de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor în vederea detectării materialului modificat genetic pentru care o procedură de autorizare este în curs de desfășurare sau a cărei autorizare a expirat,

eșantionul agregat pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului agregat trebuie să fie de cel puțin 10,5 kg și pentru soia de 7 kg. Pentru alte semințe și boabe, precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului agregat de 4 kg corespunde unui număr de peste 35 000 de semințe/boabe.

(*3) În cazul furajelor ambalate, poate fi posibil, de asemenea, să nu se atingă dimensiunea de 4 kg pentru eșantionul agregat în funcție de dimensiunea unităților individuale.

(*4) În cazul în care se referă la furajele grosiere sau la nutreț cu o densitate specifică redusă (de exemplu, fân, paie), eșantionul agregat trebuie să aibă o dimensiune minimă de 1 kg.

7. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIOANELE FINALE

Eșantioane finale

Este necesară analiza a cel puțin un eșantion final. Cantitatea din eșantionul final de analizat nu poate fi mai mică decât cantitățile de mai jos:

Furaje solide	500 g (*1) (*2) (*3) (*4)
Furaje lichide sau semilichide	500 ml (*1)

(*1) Eșantionul final pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 10 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului final trebuie să fie de cel puțin 3 000 g și pentru soia de 2 000 g. Pentru alte semințe și boabe, precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului final de 500 g corespunde unui număr de peste 10 000 de semințe/boabe.

(*2) În cazul în care dimensiunea eșantionului agregat este semnificativ mai mică de 4 kg sau litri (a se vedea notele de subsol de la punctul 6), se poate preleva, de asemenea, o cantitate mai mică de eșantion final, cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.

(*3) În cazul eşantionării leguminoaselor, boabelor de cereale şi fructelor nucifere pentru determinarea reziduurilor de pesticide, dimensiunea minimă a eşantionului final este de 1 kg în conformitate cu Metodele de prelevare a probelor pentru controlul oficial al reziduurilor de pesticide de pe şi din plante şi produse de origine vegetală şi animală, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.1004/2010.

(*4) În cazul examinării prin inspecţie vizuală sau prin microscopie, cantitatea eşantionului final pentru examinare este de 1 kg.

8. METODA DE EŞANTIONARE PENTRU LOTURI FOARTE MARI SAU LOTURI DEPOZITATE SAU TRANSPORTATE ÎNTR-UN MOD CARE NU PERMITE EŞANTIONAREA ÎNTREGULUI LOT

8.1. *Principii generale*

În cazul în care modul de transport sau de depozitare a unui lot nu permite prelevarea de eşantioane elementare din întregul lot, eşantionarea unor astfel de loturi trebuie, de preferinţă, să fie efectuată atunci când lotul se află în flux.

În cazul antrepozitelor mari destinate să stocheze furajele, operatorii trebuie să fie încurajaţi să instaleze echipamente în antrepozit care să permită eşantionarea (automată) a întregului lot stocat.

În cazul aplicării procedurilor de eşantionare prevăzute la prezentul punct, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul său este informat cu privire la procedura de eşantionare. În cazul în care procedura de eşantionare este pusă sub semnul întrebării de către operatorul din sectorul hranei pentru animale sau de către reprezentantul acestuia, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul acestuia va permite autorităţii competente să preleveze eşantioane din întregul lot pe cheltuiala sa.

8.2. *Loturile mari transportate pe cale navală*

8.2.1. *Eşantionarea dinamică a loturilor mari transportate pe cale navală*

Eşantionarea loturilor mari în nave se efectuează de preferinţă în timp ce produsul este în flux (eşantionare dinamică).

Eşantionarea se face per stivă (entitate care poate fi separată fizic). Stivele sunt, totuşi, golite parţial una după alta, astfel încât separarea fizică iniţială nu mai există după transferul în instalaţiile de depozitare. Prin urmare, eşantionarea poate fi

efectuată în funcție de separarea fizică inițială sau în funcție de separarea după transferul în instalațiile de depozitare.

Descărcarea unei nave poate dura câteva zile. În mod normal, eșantionarea trebuie să fie efectuată la intervale de timp regulate pe întreaga durată a descărcării. Cu toate acestea, nu este întotdeauna posibil sau adecvat pentru un inspector să fie prezent pentru eșantionare pe parcursul întregii operațiuni de descărcare. Prin urmare, se permite eșantionarea unei părți (lot eșantionat) din întregul lot. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat.

În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele de siguranță, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

Chiar dacă eșantionul oficial este prelevat automat, prezența unui inspector este necesară. Cu toate acestea, în cazul în care se efectuează o prelevare automată cu parametri prestabiliți care nu pot fi schimbați în cursul eșantionării și eșantioanele elementare sunt colectate într-un recipient închis, împiedicând orice posibilă fraudă, prezența unui inspector este necesară numai la începutul eșantionării, de fiecare dată când recipientul în care se află eșantioanele trebuie să fie schimbat și la sfârșitul eșantionării.

8.2.2. *Eșantionarea loturilor transportate pe cale navală prin eșantionare statică*

În cazul în care eșantionarea se efectuează în mod static, trebuie aplicată aceeași procedură ca și cea prevăzută pentru spațiile de depozitare (silozuri) accesibile din partea de sus (a se vedea punctul 8.4.1).

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă (de sus) din lot/stivă. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele de siguranță, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

8.3. *Eșantionarea loturilor mari depozitate în antrepozite*

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele de siguranță, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

8.4. *Prelevarea de eșantioane din spații de depozitare (silozuri)*

8.4.1. *Prelevarea de eșantioane din silozuri (ușor) accesibile din partea de sus*

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele de siguranță, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

8.4.2. *Prelevarea de eșantioane din silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise)*

8.4.2.1. *Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea > 100 de tone*

Furajele depozitate în astfel de silozuri nu pot fi eșantionate în mod static. Prin urmare, în cazul în care furajele din siloz trebuie să fie eșantionate și nu există nicio posibilitate de a deplasa lotul, trebuie să se ajungă la un acord cu operatorul conform căruia acesta trebuie să informeze inspectorul cu privire la momentul în care silozul va fi descărcat pentru a permite eșantionarea atunci când furajul este în flux.

8.4.2.2. *Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea < 100 de tone*

Procedura de eșantionare implică introducerea într-un recipient a unei cantități de 50-100 kg și prelevarea eșantionului din aceasta. Dimensiunea eșantionului agregat corespunde cu întregul lot, iar numărul de eșantioane elementare este legat de cantitatea din siloz introdusă într-un recipient pentru eșantionare. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând

cerințele de siguranță, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

8.5. *Eșantionarea furajelor vrac în recipiente mari închise*

Adesea, astfel de loturi pot fi eșantionate numai atunci când sunt descărcate. În anumite cazuri nu este posibil să se descarce loturile la punctul de import sau de control și, prin urmare, eșantionarea ar trebui să aibă loc atunci când aceste recipiente sunt descărcate.

9. INSTRUCȚIUNI PENTRU PRELEVAREA, PREPARAREA ȘI AMBALAREA EȘANTIOANELOR

9.1. *Generalități*

Eșantioanele trebuie prelevate și preparate fără întârzieri inutile, luând în considerare precauțiile necesare pentru a garanta că produsul nu este nici modificat, nici contaminat. Instrumentele, suprafețele de lucru și recipientele destinate colectării de eșantioane trebuie să fie curate și uscate.

9.2. *Eșantioane elementare*

Eșantioanele elementare trebuie prelevate în mod aleatoriu și distribuite uniform din întregul lot eșantionat, iar dimensiunile lor trebuie să fie aproximativ egale.

Dimensiunea eșantionului elementar este de cel puțin 100 de grame sau 25 de grame în cazul furajelor grosiere sau al nutrețului cu o densitate specifică redusă.

În cazul în care, în conformitate cu normele pentru procedura de eșantionare stabilite la punctul 8, trebuie prelevate mai puțin de 40 de eșantioane elementare, dimensiunea eșantioanelor elementare se determină în funcție de dimensiunea necesară a eșantionului agregat (a se vedea punctul 6).

În cazul eșantionării loturilor de dimensiuni reduse de furaje ambalate în cazul cărora, conform cerințelor cantitative, trebuie prelevat un număr limitat de eșantioane elementare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originale al cărei conținut nu depășește 1 kg sau un litru.

În cazul eșantionării furajelor ambalate compuse din unități mici (de exemplu, < 250 g), dimensiunea eșantionului elementar depinde de dimensiunea unității.

În cazul eşantioanelor din vânzările la distanță, dimensiunea eşantionului elementar depinde de dimensiunea unității și poate conține, de asemenea, mai puțin de 100 g sau 100 ml în cazuri individuale.

9.2.1. *Furaje vrac*

După caz, eşantionarea poate fi efectuată atunci când lotul eşantionat este în flux (încărcare sau descărcare).

9.2.2. *Furaje ambalate*

După selectarea numărului necesar de unități pentru eşantionare, conform indicațiilor de la punctul 5, o parte a conținutului fiecărei unități se îndepărtează folosind o sondă sau o lopată. Dacă este necesar, eşantioanele se prelevează după ce unitățile au fost golite separat.

9.2.3. *Furaje lichide sau semilichide, omogene sau omogenizabile*

După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, conținutul se omogenizează, dacă este necesar, și se prelevează o cantitate din fiecare unitate.

Eşantioanele elementare pot fi prelevate la descărcarea conținutului.

9.2.4. *Furaje lichide sau semilichide, neomogenizabile*

După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, se prelevează eşantioane de la diferite niveluri.

Eşantioanele se pot preleva și în timpul descărcării conținutului, dar primele fracțiuni se îndepărtează.

În oricare dintre cazuri, volumul total prelevat nu trebuie să fie mai mic de 10 litri.

9.2.5. *Blocuri de furaje și brichete minerale*

După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de blocuri sau brichete, conform indicațiilor de la punctul 5, se prelevează o parte din fiecare bloc sau brichetă. În cazul în care există suspiciuni legate de un bloc sau de o brichetă neomogen(ă), întregul bloc sau întreaga brichetă poate fi considerat(ă) ca eşantion.

În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.

9.3. Prepararea eşantioanelor agregat

Eşantioanele elementare se amestecă pentru a forma un singur eşantion agregat.

9.4. Prepararea eşantioanelor finale

Materialul din eşantionul agregat se amestecă cu grijă.

Fiecare eşantion este introdus într-un recipient corespunzător. Se iau toate precauțiile necesare pentru evitarea oricărei modificări de compoziție a eşantionului, a contaminării sau a falsificării, care ar putea avea loc în timpul transportării sau depozitării.

9.4.1. Substanțe distribuite uniform

În cazul controlului constituenților sau substanțelor uniform distribuite în întregul furaj, eşantionul agregat poate fi redus în mod reprezentativ la cel puțin 2,0 kg sau 2,0 l (eşantion redus), de preferință prin utilizarea fie a unui separator mecanic, fie a unui separator automat. Pentru controlul prezenței de reziduuri de pesticide în leguminoase, boabe de cereale și fructe nucifere, dimensiunea minimă a eşantionului redus este de 3 kg. În cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator sau separatorul nu este disponibil, eşantionul poate fi redus prin metoda sferturilor.

Din eşantionul agregat sau din eşantioanele reduse se prelevează eşantioanele finale (pentru control, apărare și, eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.

9.4.2. Substanțe distribuite neuniform

În cazul controlului constituenților, inclusiv materialul modificat genetic sau substanțele care ar putea fi distribuite neuniform în furaje, eşantionul agregat trebuie să fie:

(i) complet omogenizat. Apoi, din eşantionul agregat omogenizat se prelevează eşantioanele finale (pentru control, apărare și, eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7; sau

(ii) redus la cel puțin 2 kg sau 2 litri (⁷) prin utilizarea unui separator mecanic sau automat. Numai în cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator, eşantionul poate, dacă este necesar, să fie redus prin metoda sferturilor. Pentru controlul prezenței materialului modificat genetic, eşantionul redus trebuie să conțină

cel puțin 35 000 de semințe/boabe pentru a permite obținerea eșantioanelor finale de cel puțin 10 000 de semințe pentru asigurarea respectării legislației, apărare și, eventual, referință [a se vedea nota de subsol (**) de la punctul 6 și nota de subsol (*) de la punctul 7].

Din eșantionul redus se prelevează eșantioanele finale de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.

9.5. *Ambalarea eșantioanelor*

Recipientele sau ambalajele se sigilează și se etichetează astfel încât să nu poată fi deschise fără a deteriora sigiliul. Eticheta completă se încorporează în sigiliu. În mod alternativ, eșantionul poate fi pus într-un recipient care poate fi închis astfel încât să nu poată fi deschis fără a deteriora în mod ireversibil recipientul, evitând reutilizarea recipientului.

9.6. *Expedierea eșantioanelor către laborator*

Eșantionul trebuie să fie trimis fără întârzieri inutile la laboratorul analitic desemnat, împreună cu informațiile necesare laborantului.

10. PROCESUL-VERBAL DE EȘANTIONARE

Pentru fiecare eșantion se întocmește un proces-verbal, care permite identificarea fără ambiguități a lotului eșantionat și a dimensiunii acestuia.

Procesul-verbal trebuie să menționeze, de asemenea, orice abatere de la procedura de eșantionare, astfel cum se prevede în prezenta anexă.

Procesul-verbal trebuie pus atât la dispoziția laboratorului de control oficial, cât și la dispoziția operatorului din sectorul hranei pentru animale și/sau a laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale.

11. EȘANTION DIN VÂNZARE LA DISTANȚĂ

— Pentru un eșantion din vânzare la distanță, furajul se solicită operatorului din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță. În acest caz, atunci când solicită furajul, autoritatea competentă nu trebuie să se identifice cu o identitate oficială operatorului din sectorul hranei pentru animale și poate utiliza o identitate falsă.

— Eșantionul agregat și eșantioanele finale ale eșantionului din vânzarea la distanță trebuie prelevate imediat după primirea transportului de către persoane autorizate în

acest scop. Pentru generarea eşantionului agregat, trebuie prelevat un număr adecvat de eşantioane elementare aleatorii şi uniform distribuite din cantitatea totală obţinută şi amestecate/omogenizate cu grijă, în conformitate, pe cât posibil, cu principiile stabilite la punctul 5 şi la punctele 9.2 şi 9.3. În cazul în care furajul este ambalat în unităţi individuale, trebuie să se obţină cel puţin 4 unităţi din care trebuie prelevat cel puţin un eşantion elementar. În cazul în care se demonstrează, de la caz la caz, că unităţile obţinute provin din loturi diferite, numărul de unităţi care trebuie eşantionate trebuie redus şi limitat la unităţile care provin din acelaşi lot. În cazul analizării eşantionului din vânzare la distanţă pentru constituenţi sau substanţe care sunt distribuite neuniform în furaje, numărul de eşantioane elementare trebuie să fie de cel puţin 2,5 ori mai mare decât cel al eşantioanelor analizate pentru substanţe distribuite uniform în furaj.

Din eşantionul agregat se prelevează apoi eşantioanele finale corespunzătoare (pentru control, pentru apărare şi, eventual, pentru referinţă) în conformitate, în măsura posibilului, cu principiile prevăzute la punctul 9.4, iar procesul-verbal de eşantionare indică faptul că eşantionul este un eşantion din vânzare la distanţă. Autoritatea competentă informează imediat operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare. Operatorul din sectorul hranei pentru animale este, de asemenea, informat că un eşantion (pentru apărare) este păstrat, atunci când este posibil, la dispoziţia sa de către autoritatea competentă, într-un loc specificat, în scopuri de apărare, sau este trimis operatorului din sectorul hranei pentru animale sau laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale în conformitate cu normele naţionale în vigoare.

În cazul în care eşantionul este trimis direct laboratorului oficial, eşantionul final trebuie preparat şi sigilat în laborator de către persoane autorizate în acest scop sau în prezenţa unor persoane autorizate în acest scop. Procesul-verbal de eşantionare a eşantionului din vânzarea la distanţă trebuie trimis imediat după formarea eşantioanelor finale autorităţii competente, care informează operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare.

Se consideră că respectiva cantitate furnizată autorităţii competente de către operatorul din sectorul hranei pentru animale reprezintă o parte dintr-un lot de hrană pentru animale din aceeaşi clasă sau cu aceeaşi descriere. În conformitate cu art.9 la Legea nr. 306/2028 privind siguranţa alimentelor, în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerinţele de siguranţă, se presupune, şi în cazul unui eşantion din vânzare la distanţă, că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepţia cazului în care, în urma unei evaluări detaliate (după caz, în

cadrul unei inspecții la fața locului), se constată că nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.

Anexă nr.2
la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

DISPOZIȚII GENERALE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ A FURAJELOR

A. PREPARAREA EȘANTIOANELOR PENTRU ANALIZĂ

1. *Obiectiv*

Procedurile descrise în prezenta anexă se referă la prepararea pentru analiză a eșantioanelor trimise laboratoarelor de control după eșantionare conform dispozițiilor prevăzute în anexa nr. 1.

Eșantioanele de laborator trebuie pregătite astfel încât cantitățile prelevate, astfel cum se prevede în metodele de analiză, să fie omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

În plus față de procedurile descrise în prezenta anexă, trebuie respectate orientările pentru prepararea eșantioanelor prevăzute în SM EN ISO 6498:2016.

2. *Măsuri de precauție*

Procedura de preparare a eșantioanelor care trebuie urmată este în funcție de metodele de analiză care trebuie utilizate și de constituenții sau substanțele care trebuie controlate. De aceea, este extrem de important ca procedura de preparare a eșantioanelor urmată să fie adecvată pentru metoda de analiză utilizată și pentru constituenții sau substanțele care trebuie controlate.

Toate operațiunile necesare trebuie să se efectueze astfel încât să se evite, pe cât posibil, contaminarea eșantionului și modificarea compoziției acestuia.

Măcinarea, amestecarea și cernerea se efectuează fără întârziere în condițiile unei expuneri minime a eșantionului la aer și la lumină. Nu se utilizează râșnițe sau aparate de măcinat care ar putea cauza încălzirea semnificativă a eșantionului.

Se recomandă ca furajele foarte sensibile la căldură să fie măcinate manual. Trebuie, de asemenea, să se asigure că aparatul în sine nu constituie o sursă de contaminare.

Omogenizarea eșantionului prin prepararea unei suspensii prin amestecare cu apă cu ajutorul unui mixer cu forfecare înaltă s-a dovedit a furniza, în anumite cazuri, subeșantioane mai omogene decât omogenizarea/măcinarea uscată, în special în cazul substanțelor chimice distribuite eterogen. Cu toate acestea, omogenizarea printr-o măcinare uscată suficientă ar putea oferi subeșantioane omogene.

În anumite cazuri, cum ar fi pentru determinarea cornului secarei, a impurităților botanice nocive etc., omogenizarea eșantionului nu poate fi realizată prin măcinare, ci prin amestecarea suficientă a eșantionului.

Dacă prepararea nu poate fi efectuată fără modificări semnificative ale conținutului de umiditate al eșantionului, se determină conținutul de umiditate înainte și după preparare, în conformitate cu metoda menționată în partea A din anexa nr.3.

3. Procedura

3.1. Procedura generală

Alicota de test este prelevată din eșantionul final omogenizat. Formarea unui con și selectarea de sferturi nu sunt recomandate deoarece ar putea să se formeze alicote de test care să dea naștere la erori de separare mari.

3.1.1. Furaje care pot fi măcinate ca atare

— Se amestecă eșantionul final și se introduce într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă din nou pentru a asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantității pentru analiză (alicota de test).

3.1.2. Furaje care pot fi măcinate după uscare

— Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, eșantionul final se deshidratează astfel încât umiditatea sa să se reducă la 8-12 %, în conformitate cu procedura de preuscare descrisă la punctul 4.3 din metoda de determinare a umidității

menționată în partea A din anexa nr. 3. Se procedează apoi în conformitate cu indicațiile de la punctul 3.1.1.

3.1.3. Furaje lichide sau semilichide

— Se recoltează eșantionul final într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un sistem de închidere ermetică. Se amestecă cu grijă pentru a se asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantității pentru analiză (alicota de test).

3.1.4. Alte furaje

— Eșantioanele finale care nu pot fi preparate conform uneia dintre procedurile indicate anterior se tratează prin orice altă procedură prin care se asigură că cantitățile prelevate pentru analiză (alicota de test) sunt omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale.

3.2. Proceduri specifice în cazul examinării prin inspecție vizuală sau la microscop sau în cazurile în care întregul eșantion agregat se omogenizează

— În cazul unei examinări prin inspecție vizuală (fără a recurge la microscop), întregul eșantion agregat sau final se utilizează pentru examinare.

— În cazul unei examinări microscopice, laboratorul poate reduce eșantionul agregat sau poate efectua o reducere ulterioară a eșantionului redus. Eșantioanele finale pentru apărare și, eventual, pentru referință sunt prelevate în urma unei proceduri echivalente cu procedura urmată pentru eșantionul final pentru asigurarea respectării legislației.

— În cazul în care întregul eșantion agregat este omogenizat, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat.

— Pentru determinarea cornului secarei și a impurităților botanice nocive, eșantionul final trebuie împărțit în două subeșantioane cu o greutate egală de aproximativ 500 de grame. Se examinează un subeșantion. În cazul în care rezultatul subeșantioanelor este mai mic sau egal cu 50 % (prag analitic) din nivelul maxim, eșantionul este conform cu nivelul maxim. Dacă rezultatul este mai mare de 50 % din nivelul maxim, este necesar să se examineze un alt subeșantion și pentru verificarea conformității cu nivelul maxim se utilizează media rezultatului celor două subeșantioane.

4. Depozitarea eșantioanelor

Eșantioanele trebuie păstrate la o temperatură care să nu le altereze compoziția. Eșantioanele destinate analizării prezenței vitaminelor sau substanțelor

foarte sensibile la lumină se păstrează în condiții care să garanteze că eșantionul nu este afectat în mod negativ de lumină.

B. DISPOZIȚII PRIVIND REACTIVII ȘI APARATURA UTILIZATE ÎN METODELE DE ANALIZĂ

1. Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, toți reactivii destinați analizelor trebuie să fie puri din punct de vedere analitic (p.a.). Pentru analiza prezenței oligoelementelor, puritatea reactivilor se controlează printr-un test martor. În funcție de rezultatele obținute, poate fi necesară o purificare suplimentară a reactivilor.

2. Pentru orice operație care implică prepararea soluțiilor, diluția, clătirea sau spălarea, menționate în metodele de analiză și pentru care nu există indicații referitoare la natura solventului sau diluantului, se utilizează apa. Ca regulă generală, se utilizează apă demineralizată sau distilată. În cazuri speciale, care sunt indicate în metodele de analiză, apa trebuie supusă unor proceduri de purificare speciale.

3. Având în vedere dotarea uzuală a laboratoarelor de control, în metodele de analiză se menționează doar instrumentele și aparatura speciale sau care au utilizări specifice. Ele trebuie să fie curate, în special în cazul determinării unor cantități foarte mici de substanțe.

C. APLICAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI PREZENTAREA REZULTATELOR

1. Procedura de extracție

O serie de metode determină o procedură de extracție specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de extracție decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de extracție utilizată are, pentru matricea analizată, o eficiență de extracție echivalentă cu procedura menționată în metodă.

2. Procedura de purificare

O serie de metode determină o procedură de purificare specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de purificare decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de purificare utilizată determină, pentru matricea analizată, rezultate analitice echivalente cu procedura menționată în metodă.

3. Numărul de determinări

În cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile, dacă rezultatul primei determinări este semnificativ ($> 50\%$) mai mic decât specificația de control,

nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară.

În cazul controlului nivelurilor minime sau maxime de aditivi furajeri, dacă rezultatul primei determinări este peste nivelul minim sau sub nivelul maxim, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară.

În cazul controlului privind conținutul declarat pentru o anumită substanță sau un anumit ingredient, dacă rezultatul primei determinări confirmă conținutul declarat, adică rezultatul analizei se situează în interiorul intervalului de variație acceptat, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară (rezultatul analitic mediu se încadrează sau nu în intervalul acceptabil de variație a conținutului declarat).

În unele cazuri, acest interval acceptabil de variație este definit în Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020.

4. *Raportarea metodei de analiză utilizate*

Raportul de analiză menționează metoda de analiză utilizată.

5. *Raportarea rezultatului analitic*

Rezultatul analitic se exprimă în maniera indicată în metoda de analiză, cu un număr adecvat de zecimale și se ajustează, dacă este cazul, la conținutul de umiditate al eșantionului final înainte de preparare.

Majoritatea nivelurilor reglementate (de exemplu, nivelul maxim, nivelul minim) din legislația națională privind hrana pentru animale sunt stabilite în raport cu un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %. Prin urmare, în aceste cazuri, pentru

a evalua rezultatul analitic măsurat pe eşantion în raport cu nivelul de reglementare, rezultatul analitic trebuie mai întâi împărțit la conținutul de substanță uscată al eşantionului (în %) înmulțit cu 88, astfel cum se indică în următoarea formulă:

$$R_{12\%} = \frac{88 R_{ana}}{100 - Mc} \text{ unde:}$$

Mc : conținutul de umiditate al eşantionului (în %). $100 - Mc$ reprezintă, prin urmare, conținutul de substanță uscată al eşantionului (în %).

R_{ana} : rezultatul analitic măsurat pe eşantion

$R_{12\%}$: rezultat pentru un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %; a se evalua în raport cu nivelul de reglementare.

În plus, dacă sunt îndeplinite următoarele condiții:

— rezultatul analizei este semnificativ ($> 50\%$) mai mic sau mai mare decât informațiile de etichetare/specificațiile care trebuie controlate (după caz, dacă trebuie controlat nivelul maxim, respectiv minim al informațiilor de etichetare/specificații);

— conținutul de umiditate al furajelor eşantionate este cunoscut și se poate stabili faptul că corecția conținutului de umiditate nu va modifica evaluarea,

atunci, cu condiția ca procedurile de calitate adecvate să fie aplicate și ca analiza să servească doar la verificarea conformității cu dispozițiile legale, corecția conținutului de umiditate ar putea fi omisă (de exemplu, în cazurile în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care acest lucru este necesar pentru interpretare.

În cazul în care rezultatul analitic este ajustat pentru conținutul de umiditate, incertitudinea de măsurare corespunzătoare trebuie, de asemenea, să fie ajustată în cadrul aceleiași proceduri.

În cazul determinării cornului secarei sau a impurităților botanice nocive prin examinare vizuală/microscopică, nu este necesară ajustarea conținutului de umiditate.

6. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile

În ce privește substanțele indezirabile, în sensul Cerințelor sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, un

produs destinat utilizării în furaje se consideră neconform cu conținutul maxim stabilit dacă rezultatul analitic calculat ca media a două determinări independente, referitor la un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat ca depășind conținutul maxim, ținând cont de incertitudinea de măsurare analitică extinsă folosind un factor de acoperire 2 care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 % și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă. Această procedură se aplică numai în cazurile în care metoda de analiză permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse și a ajustării pentru recuperare. (de exemplu, nu este necesar în cazul examinării vizuale/microscopice).

În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens.

Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse):

(a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %.

(b) ca „ $x \pm U$ ”, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.

Totuși, dacă rezultatul analizei este semnificativ ($> 50\%$) mai mic decât specificația de control și cu condiția ca procedurile calitative corespunzătoare să fie aplicate și ca analiza să servească doar verificării conformității cu prevederile legale, raportarea ratei de recuperare și a incertitudinii de măsurare analitică extinse ar putea fi omisă (de exemplu, în cazul în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care incertitudinea de măsurare este necesară pentru interpretare.

7. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizei conținutului de aditivi furajeri

Pentru a verifica conformitatea cu conținutul minim și maxim autorizat de aditivi furajeri, prezența unui aditiv furajer este considerată neconformă cu conținutul minim și maxim stabilit dacă rezultatul analitic, calculat ca media două determinări independente, în raport cu un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat:

— că depășește conținutul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă;

— că este sub conținutul minim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a adăugat incertitudinea de măsurare analitică extinsă.

În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens.

Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse):

(a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %.

(b) ca „ $x \pm U$ ”, unde x este rezultatul analitic (media a două determinări) și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.

METODE DE ANALIZĂ DE CONTROL AL COMPOZIȚIEI MATERIILOR PRIME FURAJERE ȘI AL FURAJELOR COMBINATE

A. DETERMINAREA UMIDITĂȚII

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Această metodă permite determinarea conținutului de umiditate al furajelor. În cazul furajelor care conțin substanțe volatile, cum sunt acizii organici, este de notat că o dată cu determinarea conținutului de umiditate se determină și un număr semnificativ de substanțe volatile.

Metoda nu se aplică în cazul analizei produselor lactate utilizate ca materii prime furajere și al furajelor combinate care constau în principal din produse lactate, analizei grăsimilor și uleiurilor de origine animală și vegetală sau analizei semințelor și a fructelor oleaginoase.

Determinarea conținutului de umiditate din semințele oleaginoase se determină prin metoda prevăzută în SM EN ISO 665:2020 „Determinarea conținutului de umiditate și de materii volatile”, cu mențiunea că boabele de soia trebuie să fie măcinate înainte de determinarea conținutului de umiditate.

2. *Principiu*

Eșantionul se deshidratează în condiții specificate, care variază în funcție de natura furajelor. Pierderea de greutate se determină prin cântărire. Este necesar să se efectueze o uscare prealabilă atunci când se analizează furaje solide cu conținut ridicat de umiditate.

3. *Aparatură*

3.1. Moară construită dintr-un material care nu absoarbe umiditatea, ușor de curățat, care permite o zdrobire rapidă și uniformă, fără a provoca încălzire semnificativă, care evită pe cât posibil contactul cu aerul exterior și care corespunde cerințelor menționate la punctele 4.1.1 și 4.1.2 (de exemplu, micro-mori cu ciocane sau răcite cu apă, mori conice pliabile sau mori cu mecanism lent sau cu discuri dințate).

3.2. Balanță analitică, cu toleranță de 1 mg.

3.3. Recipiente uscate din metal care nu se corodează sau din sticlă cu capace ermetice; suprafața de lucru permite împrăștierea eșantionului până la aproximativ 0,3 g/cm².

3.4. Cuptor izoterm cu încălzire electrică (± 2 °C), ventilat corespunzător și care asigură o reglare rapidă a temperaturii.

3.5. Cuptor vidat cu încălzire electrică, reglabil, dotat cu o pompă de ulei și cu: fie un mecanism de introducere a aerului fierbinte uscat, fie un agent de desicare (de exemplu, oxid de calciu).

3.6. Desicator cu o placă din metal sau porțelan, groasă, perforată, conținând un agent de desicare eficient.

4. Procedura

N.B.: Operațiile descrise în această secțiune se efectuează imediat după deschiderea ambalajelor care conțin eșantioanele. Analizele trebuie să fie efectuate cel puțin în duplicat.

4.1. Preparare

4.1.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.1.2 și 4.1.3

Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Dacă este necesar, se zdrobește sau se divizează astfel încât să se evite orice variație a conținutului de umiditate (a se vedea punctul 6).

4.1.2. Cereale și tărâțe

Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Se macină în particule din care cel puțin 50 % trec printr-o sită cu orificii de 0,5 mm și care nu determină un reziduu mai mare de 10 % în cazul folosirii unei site cu orificii rotunde cu diametru de 1 mm.

4.1.3. Furaje lichide sau păstoase, furaje constituite în mod predominant din uleiuri și grăsimi

Se prelevează aproximativ 25 g din eșantion, se cântărește cu o abatere de 10 mg, se adaugă o cantitate adecvată de nisip anhidru cântărită cu o abatere de 10 mg și se amestecă până la obținerea unui produs omogen.

4.2. Uscare

Se usucă un recipient (punctul 3.3) împreună cu capacul său în cuptorul reglat la 103 °C timp de 30 de minute +/- 1 min. Se scoate din cuptor și se lasă să se răcească la temperatura ambiantă în desicator (punctul 3.6).

4.2.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.2.2 și 4.2.3

Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 1 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 103 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de patru ore, calculate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 103 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.

În cazul furajelor constituite în mod predominant (> 50 %) din uleiuri și grăsimi de origine animală și vegetală, uscarea în cuptor se prelungește cu 30 de minute, la 103 °C. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

4.2.2. Cereale, făină fină, tărate și făină grunjoasă

Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion măcinat și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 130 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de două ore, considerate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 130 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.

4.2.3. Furaje combinate conținând peste 4 % zaharoză sau lactoză: materii prime furajere precum semințele de roșcove, produsele cerealiere hidrolizate, semințele de malt, bucăți de sfeclă uscată, solubilizate de pește și zaharuri

Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul vidat (punctul 3.5) preîncălzit la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C.

Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil.

Se aduce presiunea la 100 Torr și se lasă la uscat, la această presiune, timp de patru ore, fie într-un curent de aer uscat și cald, fie cu ajutorul unui agent de desicare (aproximativ 300 g pentru 20 de eșantioane). În al doilea caz, pompa de vid se deconectează după ce se obține presiunea recomandată. Durata de uscare se calculează din momentul în care temperatura în cuptor revine la o valoare cuprinsă între 80 °C și 85 °C. Presiunea cuptorului se readuce cu grijă până la nivelul presiunii atmosferice. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate recipientul din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. Uscarea în cuptorul vidat se prelungește cu încă 30 de minute la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C și se recântărește. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

4.3. Uscarea prealabilă (parțială)

Este necesară uscarea parțială a furajelor „umede” cu o fracțiune masică mai mică de 85 % substanță uscată (de exemplu, nutreț, rații totale amestecate, furaje nelichide) înainte de măcinarea fină, pentru a analiza substanțele stabile ale acestora; pentru substanțele instabile, uscarea parțială nu este posibilă.

Uscarea parțială se poate efectua cu un cuptor cu aer forțat, cu un cuptor cu microunde sau prin liofilizare. Cu excepția uscării parțiale prin liofilizare, scopul este uscarea furajului menținând în același timp temperatura eșantionului sub 60 °C, astfel încât compoziția chimică să fie minim afectată. Uscarea la temperaturi mai mari de 60 °C provoacă modificări chimice în furaje (de exemplu, degradarea proteinelor). Furajul uscat se echilibrează la temperatura camerei timp de aproximativ 15 minute înainte de măsurarea materiei uscate parțiale, astfel încât să se reducă la minimum modificarea potențială a umidității care poate apărea în timpul măcinării și depozitării. Uscarea la temperaturi mai mici de 60 °C nu îndepărtează toată apa din furaj; prin urmare, uscarea parțială (inițială) nu reprezintă substanța uscată totală a furajului. După uscare, subeșantionul este măcinat și analizat pentru a se stabili conținutul de substanță uscată (finală) al eșantionului parțial uscat (restul de umiditate între 3 % și 15 %) atunci când se determină alți constituenți chimici.

Prin urmare, se recomandă o procedură în două etape pentru determinarea substanței uscate. Se determină mai întâi conținutul parțial de substanță uscată (în cazul în care acesta este mai mic de 85 %), apoi se determină conținutul de substanță

uscată rămasă pe un eșantion de testat măcinat și se înmulțește substanța uscată parțială cu substanța uscată rămasă pentru a determina conținutul total de substanță uscată.

5. *Calculul rezultatelor*

Conținutul de umiditate (X) al eșantionului, în procente, se calculează prin utilizarea formulelor următoare:

5.1. *Uscare fără uscare prealabilă*

$$X = \left(\frac{m - m_0}{m} \right) 100 \quad \text{unde:}$$

m = greutatea inițială, în grame, a eșantionului de testat,

m_0 = greutatea, în grame, a eșantionului de testat uscat.

5.2. *Uscare cu uscare prealabilă* ([13](#))

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

unde:

m = greutatea inițială, în grame, a eșantionului de testat,

m_1 = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după uscare prealabilă,

m_2 = greutatea, în grame, a eșantionului de testat după zdrobire sau măcinare,

m_0 = greutatea, în grame, a eșantionului de testat uscat.

5.3. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășește 0,2 % din valoarea absolută pentru umiditate, cu excepția hranei umede pentru animale de companie și a produselor de ros pentru câini, în cazul cărora diferența nu depășește 0,5 % din valoarea absolută pentru umiditate.

6. *Observație*

Dacă zdrobirea se dovedește a fi necesară și dacă această acțiune poate modifica conținutul de umiditate al produsului, rezultatele analizei referitoare la

componentele furajelor trebuie ajustate în funcție de conținutul de umiditate al eșantionului în starea lui inițială.

B. DETERMINAREA UMIDITĂȚII DIN GRĂSIMILE ȘI ULEIURILE ANIMALE ȘI VEGETALE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea conținutului în apă și substanțe volatile din grăsimile și uleiurile animale și vegetale.

2. Principiu

Eșantionul se usucă până la atingerea greutateii constante (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg) la 103 °C. Pierderea de greutate se determină prin cântărire.

3. Aparatură

3.1. Vas cu fund plat, din material rezistent la coroziune, cu diametru de 8-9 cm și adâncime de aproximativ 3 cm.

3.2. Termometru cu bulb întărit și cu tub de expansiune la capătul superior, gradat de la aproximativ 80 °C până la cel puțin 110 °C și lung de aproximativ 10 cm.

3.3. Cuvă cu nisip sau plită.

3.4. Desicator, conținând un agent de uscare eficient.

3.5. Balanță analitică.

4. Procedura

Se cântăresc, cu o abatere de 1 mg, aproximativ 20 g din eșantionul omogenizat, în recipientul uscat și cântărit (punctul 3.1), conținând termometrul (punctul 3.2). Se încălzește pe cuva cu nisip sau pe plită (punctul 3.3), amestecând continuu cu termometrul, astfel încât temperatura să ajungă la 90 °C în aproximativ 7 minute.

Se reduce intensitatea căldurii, urmărind frecvența cu care bulele se ridică de pe fundul vasului. Temperatura nu trebuie să depășească 105 °C. Se continuă amestecarea, răzuind fundul vasului, până când bulele încetează să se mai formeze.

Pentru a asigura eliminarea completă a umidității, se reîncălzește de câteva ori la 103 ± 2 °C, răcind la 93 °C între încălziri succesive. În continuare se lasă să se

răcească la temperatura camerei în desicator (pct. 3.4) și se cântărește. Se repetă această operație până când pierderea de greutate dintre două încălziri succesive nu depășește 2 mg.

N.B. O creștere a greutății eșantionului după încălzire repetată indică oxidarea grăsimilor, caz în care rezultatul se calculează prin cântărirea imediat înainte ca greutatea să înceapă să crească.

5. *Calculul rezultatelor*

Conținutul de umiditate (X), ca procentaj din eșantion, este dat de următoarea formulă:

$$X = (m_1 - m_2) \frac{100}{m} \text{ unde:}$$

m = greutatea, în grame, a eșantionului de testat;

m_1 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său înainte de încălzire;

m_2 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său după încălzire.

Rezultatele mai mici de 0,05 % se înregistrează ca fiind „sub 0,05 %”.

Repetabilitate

Diferența de umiditate dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,1 %, în valoare absolută.

C. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE AZOT ȘI CALCULAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE BRUTE

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Prezenta metodă permite determinarea conținutului de proteine brute din furaje pe baza conținutului de azot, determinat conform metodei Kjeldahl.

2. *Principiu*

Eșantionul se dizolvă cu acid sulfuric în prezența unui catalizator. Soluția acidă se alcalinizează cu soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul se distilează și se colectează într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, al cărui exces se titrează cu o soluție etalon de hidroxid de sodiu.

Ca alternativă, amoniacul eliberat se distilează într-o soluție de acid boric în exces, urmat de titrare cu o soluție de acid clorhidric sau acid sulfuric.

3. *Reactivi*

3.1. Sulfat de potasiu.

3.2. Catalizator: oxid de cupru (II) CuO sau sulfat de cupru (II) pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3. Zinc granulat.

3.4. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.

3.5. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.6. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.7. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

3.8. Indicator roșu de metil; se dizolvă 300 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$.

3.9. Soluție de hidroxid de sodiu (se poate utiliza soluție de calitate tehnică) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.

3.10. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.11. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.12. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată.

3.13. Acetanilidă (m.p. = 114°C , conținutul în N = 10,36 %).

3.14. Zaharoză (fără azot).

3.15. Acid boric (H_3BO_3).

3.16. Soluție de indicator roșu de metil: se dizolvă 100 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol sau metanol.

3.17. Soluție de verde de bromocrezol: se dizolvă 100 mg de verde de bromocrezol în 100 ml de etanol sau metanol.

3.18. Soluție de acid boric (10 g/l-40 g/l, în funcție de aparatura utilizată)

Când se aplică detectarea prin colorimetrie a punctului final, indicatorii roșu de metil și bromocrezol trebuie adăugați la soluțiile de acid boric. Dacă se prepară 1

litru de soluție de acid boric, înainte de ajustarea de volum, se adaugă 7 ml de soluție de indicator roșu de metil (punctul 3.16) și 10 ml de soluție verde de bromocrezol (punctul 3.17).

În funcție de apa utilizată, pH-ul soluției de acid boric poate diferi de la lot la lot. pH-ul soluției de acid boric trebuie să fie între 4,3 și 4,7. Adesea este necesară o ajustare cu ajutorul unui mic volum de substanță alcalină pentru a obține un martor pozitiv.

Notă: Adăugarea a aproximativ 3-4 ml de NaOH (punctul 3.11) în 1 litru de acid boric 10 g/l oferă, de obicei, ajustări bune. Soluția se păstrează la temperatura camerei și, pe durata păstrării, se protejează de lumină și de surse de vapori de amoniac.

3.19. Acid clorhidric, soluție volumetrică standard, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Notă: Dacă în calcule se fac ajustările necesare, se pot folosi alte concentrații de soluții volumetrice (punctele 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 și 3.19). Concentrațiile se exprimă întotdeauna cu patru zecimale.

4. *Aparatură*

Aparatură adecvată pentru efectuarea dizolvării, distilării și titrării conform procedurii Kjeldahl.

5. *Procedura*

5.1. *Dizolvarea*

Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 0,001 g și se transferă eșantionul în vasul aparatului de dizolvare. Se adaugă 15 g de sulfat de potasiu (punctul 3.1), o cantitate adecvată de catalizator (punctul 3.2) [0,3-0,4 g oxid de cupru (II) sau 0,9-1,2 g sulfat de cupru (II) pentahidrat], 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.4) și, dacă este necesar, câteva granule de piatră ponce (punctul 3.12), apoi se amestecă.

Se încălzește vasul, la început moderat, agitând circular din când, dacă este cazul, până când materia s-a carbonizat și spuma a dispărut; apoi se încălzește mai intens, până când lichidul fierbe constant. Încălzirea este adecvată dacă acidul aflat în fierbere se condensează pe pereții vasului. Se previne supraîncălzirea marginilor și lipirea particulelor organice de acestea.

Când soluția devine limpede și de culoare verde deschis, se continuă fierberea timp de încă două ore, apoi se lasă să se răcească.

5.2. Distilarea

Se adaugă cu atenție apă suficientă pentru a asigura dizolvarea completă a sulfatilor. Se lasă la răcit și apoi se adaugă, dacă este cazul, câteva granule de zinc (punctul 3.3). Se procedează ca la punctul 5.2.1 sau 5.2.2.

5.2.1. Distilarea în acid sulfuric

În vasul de colectare al aparatului de distilare se introduce o cantitate de 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.5) sau (punctul 3.7), măsurată cu exactitate, în funcție de conținutul estimat de azot. Se adaugă câteva picături de indicator roșu de metil (punctul 3.8).

Se conectează vasul de dizolvare la condensatorul aparatului de distilare și se scufundă capătul condensatorului în lichidul din vasul de colectare până la o adâncime de cel puțin 1 cm (a se vedea observația 8.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9) în vasul de dizolvare, fără pierderi de amoniac (a se vedea observația 8.1). Se încălzește vasul până la distilarea completă a amoniacului.

5.2.2. Distilarea în acid boric

În cazul în care titrarea amoniacului conținut în distilat se face manual, se aplică procedura de mai jos. În cazul în care unitatea de distilare este complet automatizată, inclusiv titrarea amoniacului conținut în distilat, se urmează instrucțiunile de operare a unității de distilare puse la dispoziție de fabricant.

Sub orificiul de evacuare al condensatorului se așază un vas de colectare conținând 25-30 ml de soluție de acid boric (punctul 3.18), astfel încât tubul de evacuare se află sub nivelul suprafeței soluției de acid boric în exces. Se reglează unitatea de distilare astfel încât să elibereze 50 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9). Unitatea de distilare se operează în conformitate cu instrucțiunile fabricantului, distilându-se complet amoniacul eliberat prin adăugarea de soluție de hidroxid de sodiu. Distilatul se colectează în soluția de acid boric receptoare. Cantitatea de distilat (timpul de distilare în vapori) depinde de cantitatea de azot din eșantion. Se urmează instrucțiunile fabricantului.

Notă: În cazul unei unități de distilare semiautomate, adăugarea hidroxidului de sodiu în exces și distilarea în vapori se efectuează automat.

5.3. Titrarea

Se procedează ca la punctul 5.3.1 sau 5.3.2.

5.3.1. Acid sulfuric

Se titrează excesul de acid sulfuric în vasul de colectare cu soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11), în funcție de concentrația acidului sulfuric utilizat, până se atinge punctul final.

5.3.2. Acid boric

Cu ajutorul unei biurete se titrează conținutul vasului de colectare cu soluție volumetrică standard de acid clorhidric (punctul 3.19) sau cu soluție volumetrică standard de acid sulfuric (punctul 3.6) și se citește cantitatea de soluție de titrare utilizată.

Când se aplică detectarea colorimetrică a punctului final, acesta este atins la prima apariție în conținut a culorii roz. Citirea biuretei se estimează cu o abatere de 0,05 ml. Vizualizarea punctului final poate fi facilitată de o placă de agitator magnetic iluminat sau de un detector fotometric.

Aceasta poate fi efectuată automat prin utilizarea unui aparat de distilare cu vapori cu titrare automată.

Operarea specifică a aparatului de distilare sau a celui de distilare/titrare se face conform instrucțiunilor fabricantului.

Notă: În cazul în care se utilizează un sistem automat de titrare, aceasta începe imediat după începerea distilării și se utilizează soluția de acid boric 1 % (punctul 3.18).

În cazul care se utilizează o unitate de distilare complet automată, titrarea automată a amoniacului poate fi efectuată, de asemenea, prin detectarea punctului final cu ajutorul unui sistem pH potențiometric.

În acest caz, se utilizează un aparat de titrare automat, cu pH-metru. pH-metrul se calibrează în mod corespunzător în intervalul de pH 4-7, folosindu-se proceduri de laborator normale de calibrare a pH-ului.

Punctul final al titrării exprimat în pH este atins la valoarea de 4,6, reprezentând punctul cel mai de jos al curbei de titrare (punctul de inflexiune).

5.4. Testul martor

Pentru a confirma faptul că reactivii nu conțin azot, se efectuează un test martor (dizolvare, distilare și titrare), folosind 1 g de zaharoză (punctul 3.14) în locul eșantionului.

6. *Calculul rezultatelor*

Calcularea se efectuează în conformitate cu punctul 6.1 sau 6.2.

6.1. *Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.1*

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

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

unde:

V_0 = volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în testul martor;

V_1 = volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în titrarea eșantionului;

c = concentrația (mol/l) a hidroxidului de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11);

m = greutatea (g) a eșantionului.

6.2. *Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.2*

6.2.1. Titrare cu acid clorhidric

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

$$\frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot 1,46}{m} \cdot 25$$

unde:

m = greutatea (g) a părții de testat;

c = concentrația (mol/l) a soluției volumetric standard de acid clorhidric (punctul 3.19);

V_0 = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în testul martor;

V_1 = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în partea de testat.

6.2.2. Titrare cu acid sulfuric

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

$$\frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot 2,86,25}{m} \quad \text{unde:}$$

m = greutatea (g) a părții de testat;

c=concentrația (mol/l) a soluției volumetrice standard de acid sulfuric (punctul 3.6);

V₀=volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în testul martor;

V₁=volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în partea de testat.

7. Verificarea metodei

7.1. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

- 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %;
- 2,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %;
- 0,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %.

7.2. Reproducibilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească:

- 1,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %;
- 9,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %;
- 3,6 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %.

7.3. Acuratețea

Analiza (dizolvare, distilare și titrare) se efectuează pe o cantitate adecvată de acetanilidă (punctul 3.13) (de exemplu, 0,2-0,3 g), în prezența a 1 g zaharoză (punctul 3.14); 1 g de acetanilidă consumă 14,80 ml de acid sulfuric (punctul 3.5). Recuperarea trebuie să fie de cel puțin 99 %.

8. *Observații*

8.1. Aparatura poate fi de tip manual, semiautomat sau automat. Dacă aparatura necesită un transfer între etapele de dizolvare și distilare, acest transfer trebuie realizat fără pierderi. Dacă vasul aparatului de distilare nu este prevăzut cu o pâlnie de picurare, se adaugă hidroxidul de sodiu imediat înainte de conectarea vasului la condensator, turnând încet lichidul pe marginea vasului.

8.2. Dacă produsul de dizolvare se solidifică, se reîncepe determinarea folosind o cantitate mai mare de acid sulfuric (punctul 3.4) decât cea menționată la punctul 5.1.

8.3. Pentru produsele cu conținut scăzut de azot, volumul de acidul sulfuric (punctul 3.7) care trebuie introdus în vasul de colectare poate fi redus, dacă este cazul, la 10 sau 15 ml și completat până la 25 ml cu apă.

8.4. Pentru analizele curente, în vederea determinării conținutului de proteine brute se pot aplica metode alternative de analiză, dar metoda Kjeldahl descrisă în prezenta parte C este metoda de referință. Echivalența dintre rezultatele obținute cu metoda alternativă (de exemplu, DUMAS) și cele obținute prin metoda de referință trebuie demonstrată pentru fiecare matrice în mod individual. Întrucât rezultatele obținute cu o metodă alternativă, chiar și după verificarea echivalenței, pot devia ușor față de rezultatele obținute cu metoda de referință, este necesar a menționa în raportul analitic metoda de analiză utilizată pentru determinarea conținutului de proteine brute.

D. DETERMINAREA UREEI

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Această metodă permite determinarea conținutului de uree utilizată ca aditiv furajer în furajele pentru rumegătoare.

2. *Principiu*

Eșantionul este pus în suspensie în apă, în care s-a adăugat un produs de limpezire. Suspensia se filtrează. Conținutul în uree al filtratului este determinat după adăugarea de 4-dimetilaminobenzaldehidă (4-DMAB), prin măsurarea densității optice la o lungime de undă de 420 nm.

3. *Reactivi*

3.1. Soluție de 4-dimetilaminobenzaldehidă: se dizolvă 1,6 g de 4-DMAB în 100 ml de etanol 96 % și se adaugă 10 ml de acid clorhidric (ρ_{20} 1,19 g/ml). Acest reactiv se conservă timp de maximum două săptămâni.

3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Cărbune activ care nu absoarbe ureea (de controlat).

3.5. Uree, soluție 0,1 % (greutate/volum).

4. Aparatură

4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.

4.2. Eprubete: 160×16 mm cu dopuri de sticlă șlefuită.

4.3. Spectrofotometru.

5. Procedura

5.1. Analiza eșantionului

Se cântăresc 2 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 1 g de cărbune activ (punctul 3.4) într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml de apă și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2), se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde și se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator. Se completează volumul cu apă, se agită și se filtrează.

Se îndepărtează 5 ml de filtrat transparent și incolor, se introduc în eprubete cu dop de sticlă șlefuită, se adaugă 5 ml de soluție de 4-DMAB (punctul 3.1) și se amestecă. Se introduc eprubetele într-o baie de apă la 20°C ($\pm 4^\circ\text{C}$). După 15 minute se măsoară densitatea optică a soluției de eșantion cu spectrofotometrul la 420 nm. Se compară cu soluția de reactivi pentru testul martor.

5.2. Curba de calibrare

Se îndepărtează volume de 1, 2, 4, 5 și 10 ml din soluția de uree (punctul 3.5), se introduc în baloanele gradate de 100 ml și se completează volumul cu apă. Se îndepărtează 5 ml din fiecare soluție, se adaugă în fiecare 5 ml de soluție 4-DMAB (punctul 3.1), se omogenizează și se măsoară densitatea optică conform indicațiilor

de mai sus cu o soluție martor care conține 5 ml de 4-DMAB și 5 ml de apă în care nu există uree. Se trasează curba de calibrare.

6. *Calculul rezultatelor*

Se determină cantitatea de uree din eșantion cu ajutorul curbei de calibrare.

Rezultatul se exprimă în mg de uree per kg eșantion.

7. *Evaluarea metodei*

7.1. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească:

— La 420 nm

— 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg;

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 7 000 mg/kg;

— 20 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 7 000 mg/kg sau mai mult.

— La 435 nm

— 40 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg;

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 9 000 mg/kg;

— 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 9 000 mg/kg sau mai mult.

7.2. *Reproductibilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească:

— La 420 nm

— 3 000 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree de 12 000 mg/kg sau mai mult.

— La 435 nm

— 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 8 000 mg/kg;

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 8 000 mg/kg sau mai mult.

8. *Rezultatele unui studiu colaborativ*

A fost organizat un exercițiu de comparare interlaboratoare la nivelul UE, la care au participat 18 laboratoare. Au fost analizate cinci eșantioane pozitive de furaje combinate pentru rumegătoare (în tabelele 1 și 2, denumite MAT) (1 analiză) în duplicate oarbe, în timp ce un furaj combinat de rumegătoare martor a fost analizat o singură dată.

Calcululele pentru limitele de repetabilitate (r) și reproductibilitate (R), astfel cum sunt definite în orientările internaționale, au fost efectuate după eliminarea valorilor excepționale utilizând analiza varianței valorilor valabile.

Cifrele privind performanța calculată a metodei (repetabilitate, reproductibilitate) sunt prezentate în tabelele următoare. Pentru toate eșantioanele testate, inclusiv materialul martor, nu au fost găsite rezultate fals pozitive sau fals negative.

Tabelul 1

Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la $\lambda = 420$ nm în toate materialele

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovine	Bovine	Ovine	Ovine	Bovine
Fracție masică țintă (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071

Deviația standard a reproductibilității s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Deviația standard a repetabilității s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Deviația standard relativă a reproductibilității RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Deviația standard relativă a repetabilității RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limita reproductibilității, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Limita repetabilității, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabelul 2

Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la $\lambda = 435$ nm în toate materialele

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovine	Bovine	Ovine	Ovine	Bovine
Fracție masică țintă (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Deviația standard a reproductibilității s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Deviația standard a repetabilității s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Deviația standard relativă a reproductibilității RSD_R (%)	17	18	9	7	12

Deviația standard relativă a repetabilității RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limita reproductibilității, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Limita repetabilității, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. *Observații*

9.1. În cazul unui conținut de uree care depășește 3 %, se reduce greutatea eșantionului la 1 g sau se diluează soluția inițială astfel încât să nu fie mai mult de 50 mg de uree în 500 ml.

9.2. În cazul unui conținut mic în uree, se crește greutatea eșantionului atâta timp cât filtratul rămâne transparent și incolor.

9.3. Rezultatele de mai sus obținute în urma studiilor colaborative nu indică o diferență semnificativă de precizie între ureea măsurată la 420 nm sau la 435 nm.

E. DETERMINAREA AMINOACIZILOR (CU EXCEPȚIA TRIPTOFANULUI)

Metodele de analiză utilizate pentru determinarea aminoacizilor (cu excepția triptofanului) sunt:

— SM SR EN ISO 13903:2012 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de aminoacizi;

— SM EN ISO 17180:2016 Hrană pentru animale – Determinarea lizinei, metioninei și treoninei în produsele comerciale de aminoacizi și în preamestecuri ([15](#));

— metoda de analiză descrisă la punctele 1-10 de mai jos.

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Această metodă permite determinarea aminoacizilor liberi (sintetici și naturali) și totali (legați în peptide și liberi) din materii prime furajere, furaje combinate și preamestecuri care conțin mai puțin de 10 % ([16](#)) din fiecare aminoacid, folosind un analizator de aminoacizi. Ea este aplicabilă 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 deosebește diferite săruri ale 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 azotate coextrase se precipită cu acid sulfosalicilic și se îndepărtează prin filtrare. Soluția filtrată se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni 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 hidrolizate de eșantioane neoxidate. Toți ceilalți aminoacizi enumerați la punctul 1 (Obiectiv și domeniu de aplicare) se pot determina fie în eșantionul oxidat, fie în eșantionul neoxidat.

Oxidarea se realizează la 0 °C cu ajutorul unui amestec de acid performic și fenol. Reactivul de oxidare în exces se descompune cu disulfid de sodiu. Eșantionul oxidat sau neoxidat se hidrolizează cu acid clorhidric (punctul 3.20) timp de 23 de ore. Hidrolizatul se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni și se determină prin reacție cu ninhidrină folosind detecția fotometrică la 570 nm (440 nm pentru prolină).

3. *Reactivi*

Trebuie utilizată apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS).

3.1. Peroxid de hidrogen, g (g/g) = 30 %.

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

3.3. Fenol.

3.4. Disulfid de sodiu.

3.5. Hidroxid de sodiu.

3.6. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat.

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

3.8. Citrat trisodic dihidrat.

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 a fi utilizat ca etalon intern.

3.14. Azot, gaz (< 10 ppm oxigen).

3.15. 1-octanol.

3.16. Aminoacizi.

3.16.1. Substanțele standard ale aminoacizilor enumerați la punctul 1 (Obiect și domeniu de aplicare). Compuși puri care nu conțin deloc apă de cristalizare. Înainte de utilizare, se usucă în vid cu ajutorul P_2O_5 sau al H_2SO_4 , timp de 1 săptămână.

3.16.2. Acid cisteic.

3.16.3. Metionin sulfonă.

3.17. Soluție de hidroxid de sodiu, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:

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

3.18. Soluție de hidroxid de sodiu, $c = 1 \text{ mol/l}$:

Se dizolvă 40 g de NaOH (punctul 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 (punctul 3.2) cu 111 g de apă și se adaugă 4,73 g de fenol (punctul 3.3).

3.20. Mixtură de hidroliză, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ conținând 1 g de fenol/l:

Se adaugă 1 g de fenol (punctul 3.3) la 492 ml de HCl (punctul 3.7) și se completează cu apă până la 1 litru.

3.21. Mixtură de extracție, $c = 0,1$ mol HCl/l conținând 2 % tiodiglicol: se iau 8,2 ml de HCl (punctul 3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml de apă, se adaugă 20 ml de tiodiglicol (punctul 3.9) și se completează cu apă până la 1 litru (nu se amestecă direct 3.7 și 3.9).

3.22. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat, $\beta = 6$ %:

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

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

Se amestecă 0,5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.1) cu 4,5 ml soluție de acid formic-fenol (punctul 3.19) într-un mic pahar de laborator. Se incubează la 20-30 °C timp de 1 oră pentru a se forma acid performic, apoi se răcește în baie de apă cu gheață (15 min) înainte de a se adăuga la eșantion.

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

3.24. Soluție tampon de citrat, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:

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

3.25. Soluții tampon de eluție, preparate în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9).

3.26. Reactiv ninhidrină, preparat în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9).

3.27. Soluții etalon de aminoacizi. Aceste soluții se păstrează la o temperatură sub 5 °C.

3.27.1. Soluție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.16.1).

$c = 2,5$ $\mu\text{mol/ml}$ pentru fiecare, în acid clorhidric.

Se pot obține din surse comerciale.

3.27.2. Soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă, $c = 1,25$ $\mu\text{mol/ml}$.

Se dizolvă 0,2115 g de acid cisteic (punctul 3.16.2) și 0,2265 g de metionin sulfonă (punctul 3.16.3) în soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat de 1 litru și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat. Se

păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 12 luni. Această soluție nu se utilizează dacă soluția etalon stoc (punctul 3.27.1) conține acid cisteic și metionin sulfonă.

3.27.3. Soluție etalon stoc de etalon intern, de exemplu, norleucină, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

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

3.27.4. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ de acid cisteic și metionin sulfonă și $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ din ceilalți aminoacizi. Se dizolvă 2,2 g de clorură de sodiu (punctul 3.10) într-un pahar de laborator de 100 ml care conține 30 ml soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se adaugă 4,00 ml de soluție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.27.1), 4,00 ml soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă (punctul 3.27.2) și 0,50 ml soluție etalon stoc de etalon intern (punctul 3.27.3), dacă este cazul. Se ajustează pH-ul la valoarea 2,20 cu hidroxid de sodiu (punctul 3.18).

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

Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni.

A se vedea și observațiile de la punctul 9.1.

3.27.5. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate preparată în conformitate cu punctul 5.3.3.1 și pentru utilizare cu extracte (punctul 5.2). Soluția de calibrare se prepară în conformitate cu punctul 3.27.4, dar omițând clorura de sodiu.

Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni.

4. Aparatură

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

4.2. Sticlă din borosilicat, de 100 ml, cu un dop filetat cu căptușeală de cauciuc/teflon (de exemplu, Duran, Schott) pentru utilizare în cuptor.

4.3. Cuptor cu ventilație forțată și un regulator de temperatură cu precizie mai mare de $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4. pH-metru (cu trei zecimale).

4.5. Filtru cu membrană (0,22 μm).

4.6. Centrifugă.

4.7. Evaporator rotativ cu vid.

4.8. Agitator mecanic sau magnetic.

4.9. Analizor de aminoacizi sau echipament HPLC cu coloană schimbătoare de ioni, dispozitiv pentru ninhidrină, derivare post-coloană și detector fotometric.

Coloana este umplută cu rășini de polistiren sulfonat capabile să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. Fluxul din liniile cu soluție tampon și ninhidrină este asigurat de pompe care au o stabilitate a fluxului de $\pm 0,5 \%$ în perioada care include atât funcționarea în vederea calibrării standardului, cât și analiza eșantionului.

În cazul unor analizori de aminoacizi se pot utiliza proceduri de hidrolizare în care hidrolizatul are o concentrație de sodiu de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ și conține întreaga cantitate de acid formic rezidual din etapa de oxidare. Alți analizori nu oferă o separare satisfăcătoare a anumitor aminoacizi dacă hidrolizatul conține exces de acid formic și/sau concentrații mari 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 se face sub vid, la o temperatură maximă de 40°C .

5. Procedura

5.1. Pregătirea eșantionului

Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50°C , fie liofilizate. Eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.12) înainte de măcinare.

5.2. Determinarea aminoacizilor liberi

Se cântărește cu o abatere de 0,2 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer și se adaugă 100,0 ml de extract de mixtură (punctul 3.21). Se agită mixtura timp de 60 de minute cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (punctul 4.8). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator de 100 ml.

Se adaugă 5,0 ml de soluție de acid sulfosalicilic (punctul 3.22) în cursul agitării și se continuă agitarea cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 5 minute. Se filtrează sau se centrifughează supernatantul pentru a se îndepărta orice precipitat. Se introduc 10,0 ml din soluția rezultată într-un pahar de laborator de 100 ml și se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18), se transferă într-un balon gradat de volum adecvat utilizându-se soluție tampon de citrat (punctul 3.24) și se completează până la semn cu soluția tampon (punctul 3.24).

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

Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Dacă extractele nu se examinează în aceeași zi, trebuie păstrate la o temperatură sub 5 °C.

5.3. *Determinarea aminoacizilor totali*

5.3.1. Oxidare

Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g de eșantion preparat (punctul 5.1) într-un (într-o):

— balon cu fund rotund de 100 ml (punctul 4.1) pentru hidroliză în mediu deschis (punctul 5.3.2.3); sau

— balon cu fund rotund de 250 ml (punctul 4.1) dacă este necesară o concentrație mică de sodiu (punctul 5.3.3.1); sau

— sticlă de 100 ml dotată cu un dop filetat (punctul 4.2) (pentru hidroliză în mediu închis 5.3.2.4).

Porția de eșantion cântărită are un conținut de azot de aproximativ 10 mg și un conținut de umiditate de maximum 100 mg.

Se introduce balonul/sticla într-o baie de apă cu gheață și se răcește la 0 °C, se adaugă 5 ml de mixtură de oxidare (punctul 3.23) și se amestecă cu ajutorul unei spatule de sticlă cu vârf încovoiat. Se etanșeizează balonul/sticla conținând spatula cu ajutorul unei pelicule ermetizante, se introduce baia de apă cu gheață conținând recipientul etanșeizat într-un frigider la 0 °C și se lasă timp de 16 ore. După 16 ore,

se scoate din frigider, iar excesul de reactiv de oxidare se descompune prin adăugarea a 0,84 g de disulfid de sodiu (punctul 3.4).

Se trece la 5.3.2.1.

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. Hidroliza eșantioanelor oxidate

La eșantioanele oxidate preparate în conformitate cu punctul 5.3.1 se adaugă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) având grijă să se spele orice reziduu de eșantion de pe pereții vasului și de pe spatulă.

În funcție de procedura de hidrolizare utilizată, se trece la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hidroliza eșantioanelor neoxidate

Se cântăresc 0,1-1 g de eșantion preparat (punctul 5.1), cu o abatere de 0,2 mg, fie într-un balon cu fund rotund de 100 ml sau 250 ml (punctul 4.1), fie într-o sticlă de 100 ml dotată cu dop filetat (punctul 4.2). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă cu grijă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) și se amestecă cu eșantionul. Se procedează ca la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hidroliza în mediu deschis

Se adaugă 3 mărgelile de sticlă în mixtura din balon (preparată conform mențiunilor de la punctul 5.3.2.1 sau 5.3.2.2) și se fierbe în clocot continuu sub reflux timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se spală condensatorul cu 5 ml de soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se deconectează balonul și se răcește într-o baie de apă cu gheață.

Se procedează ca la punctul 5.3.3.

5.3.2.4. Hidroliza în mediu închis

Sticla conținând mixtura preparată conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2 se introduce în cuptor (punctul 4.3) la 110 °C. În timpul primei ore, pentru a se preveni o creștere progresivă a presiunii (datorată expansiunii substanțelor gazoase) și pentru a se evita o explozie, se plasează dopul filetat la nivelul extremității superioare a vasului. A nu se închide vasul cu dopul respectiv. După o oră, se închide vasul cu dopul respectiv și se lasă în cuptor (punctul 4.3) timp de 23 de ore. La încheierea

hidrolizei, se îndepărtează sticla din cuptor, se scoate cu grijă dopul de la nivelul sticlei, iar aceasta se introduce într-o baie de apă cu gheață. Se lasă să se răcească.

În funcție de procedura de ajustare a pH-ului (punctul 5.3.3), se transferă cantitativ conținutul sticlei într-un pahar de laborator de 250 ml sau într-un balon cu fund rotund de 250 ml, utilizând soluție tampon de citrat (punctul 3.24).

Se procedează ca la punctul 5.3.3.

5.3.3. Ajustarea pH-ului

În funcție de toleranța la sodiu a analizorului de aminoacizi (punctul 4.9), pentru ajustarea pH-ului se procedează ca la punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2.

5.3.3.1. Pentru sistemele cromatografice (punctul 4.9) necesitând o concentrație de sodiu mică.

Este recomandabil să se utilizeze o soluție etalon stoc internă (punctul 3.27.3) în cazul în care se folosesc analizori de aminoacizi necesitând o concentrație mică de sodiu (în cazul în care volumul de acid trebuie redus).

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

La hidrolizatul obținut conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se adaugă 2 picături de 1-octanol (punctul 3.15).

Utilizând un evaporator rotativ (punctul 4.7) se reduce volumul la 5-10 ml în condiții de vid la 40 °C. Dacă volumul este redus accidental la mai puțin de 5 ml, hidrolizatul trebuie aruncat, iar analiza trebuie repetată.

Se ajustează pH-ul la 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18) și se procedează ca la punctul 5.3.4.

5.3.3.2. Pentru toți ceilalți analizori de aminoacizi (punctul 4.9)

Hidrolizatele obținute conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se neutralizează parțial prin adăugarea cu grijă, în condiții de agitare continuă, a 17 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.17), asigurându-se că temperatura este menținută sub 40 °C.

Se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 la temperatura camerei prin utilizarea soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.17) și în cele din urmă a soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18). Se trece la punctul 5.3.4.

5.3.4. Soluția de eșantion pentru cromatografie

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

Dacă nu s-a utilizat deja un etalon intern, se adaugă 2,00 ml de etalon intern (punctul 3.27.3) și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se amestecă minuțios.

Se trece la etapa cromatografică (punctul 5.4).

Dacă soluțiile de eșantion nu se examinează în aceeași zi, ele se păstrează la o temperatură sub 5 °C.

5.4. Cromatografia

Înainte de cromatografie se aduce extractul (punctul 5.2) sau hidrolizatul (punctul 5.3.4) la temperatura camerei. Se agită mixtura și se filtrează o cantitate potrivită printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,22 μm (punctul 4.5). Soluția limpede rezultată se supune cromatografiei prin schimb ionic, utilizând un analizor de aminoacizi (punctul 4.9).

Injectarea poate fi efectuată manual sau automat. Este important ca aceeași cantitate de soluție $\pm 0,5\%$ să fie adăugată în coloană pentru analizarea etaloanelor și a eșantioanelor cu excepția situațiilor în care se utilizează un etalon intern și ca raporturile sodiu:aminoacizi în soluțiile de etalon și în cele de eșantion să fie cât mai similare posibil.

În general, frecvența manevrelor de calibrare depinde de stabilitatea reactivului ninhidrină și a sistemului analitic. Etalonul sau eșantionul se diluează cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) pentru a genera o arie a vârfului pentru etalon de 30-200 % din aria vârfului pentru eșantionul de aminoacid.

Cromatografia aminoacizilor va varia ușor în funcție de tipul analizorului și de rășina utilizate. Sistemul ales trebuie să fie capabil să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic generează un răspuns linear la modificările cantităților de aminoacizi adăugați la coloană.

În cursul etapei cromatografice se aplică rapoartele înălțimii corespunzătoare punctului minim:vârfului menționate mai jos, în cazul în care se analizează o soluție echimolară (de aminoacizi analizați). Această soluție echimolară trebuie să conțină

cel puțin 30 % din cantitatea maximă de aminoacizi care poate fi măsurată cu precizie cu ajutorul sistemului analizor de aminoacizi (punctul 4.9).

Pentru separarea treoninei-serinei, în cazul suprapunerii a doi aminoacizi, raportul punct minim/vârf corespunzător aminoacidului situat mai jos pe cromatogramă nu trebuie să depășească 2:10. [dacă se determină doar cist(e)ina, metionina, treonina și lizina, separarea insuficientă a vârfurilor învecinate va influența în mod negativ determinarea]. Pentru toți ceilalți aminoacizi, separarea trebuie să fie mai bună de 1:10.

Sistemul trebuie să asigure că lizina se separă de „artefactele de lizină” și de ornitină.

6. *Calculul rezultatelor*

Aria vârfului pentru eșantion și etalon se măsoară pentru fiecare aminoacid în parte, iar cantitatea (X) se calculează în g de aminoacid per kg de eșantion.

$$X = \frac{A_c M V}{B m 1000}$$

Dacă se utilizează un etalon intern se multiplică cu:

$$\frac{D}{C_A} = \text{aria vârfului, hidrolizat sau extract}$$

B = aria vârfului, soluția etalon de calibrare

C = aria vârfului, etalon intern în hidrolizat sau extract

D = aria vârfului, etalon intern, soluția etalon de calibrare

M = greutatea molară a aminoacidului determinat

c = concentrația de standard în μmol/ml

m=greutatea eșantionului (g) (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat sau degresat)

V=total hidrolizat în ml (punctul 5.3.4) sau volumul de diluție total calculat pentru extract, în ml (6.1)

Cistina și cisteina se determină amândouă ca acid cisteic în hidrolizate de eșantion oxidat, dar se calculează ca cistină (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol) folosind M 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

Metionina se determină ca metionin sulfonă în hidrolizate de eşantion oxidat, dar se calculează ca metionină folosind M pentru metionină: 149,21 g/mol.

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

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

$$F = \frac{100 \text{ ml} (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \frac{V}{10} \quad = \text{volumul extractului final}$$

7. Evaluarea metodei

Metoda a fost testată prin comparații la nivel internațional în 1990 utilizând patru furaje diferite (furaje combinate pentru porcine, furaje combinate pentru pui de carne, concentrate proteice, preamestecuri).

Notă: Metoda a fost testată în cadrul unui al doilea studiu de comparare interlaboratoare la nivel internațional în 2003 utilizând perechi de duplicate oarbe pe eşantioane de furaje de finisare pentru pui de carne, furaje starter pentru pui de carne, porumb, făină de pește și făină de păsări de curte. Pentru detalii, a se vedea SM SR EN ISO 13903:2012.

Rezultatele studiului de comparare interlaboratoare din 1990, după eliminarea valorilor extreme, exprimate ca medie și deviație standard sunt prezentate în tabelele de la acest punct:

Medii în g/kg

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaje mixte pentru porcine	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Furaj combinat pentru pui de carne	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrat proteic	22,32	5,06	12,01	47,74

	n = 16	n = 17	n = 17	n = 15
Preamestec	58,42	—	90,21	98,03
	n = 16		n = 16	n = 16
n = număr de laboratoare participante				

7.1. Repetabilitate

Repetabilitatea exprimată ca „deviație standard intralaborator” a comparației interlaboratoare din tabelul de mai sus este redată în tabelele de mai jos:

Coefficient de variație (%) pentru repetabilitate (CV_r)

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaje mixte pentru porcine	1,9	3,3	3,4	2,8
	n = 15	n = 17	n = 17	n = 13
Furaj combinat pentru pui de carne	2,1	2,8	3,1	2,1
	n = 16	n = 18	n = 18	n = 16
Concentrat proteic	2,7	2,6	2,2	2,4
	n = 16	n = 17	n = 17	n = 15
Preamestec	2,2	—	2,4	2,1
	n = 16		n = 16	n = 16
n = număr de laboratoare participante				

7.2. Reproducibilitate

Rezultatele pentru deviația standard interlaboratoare pentru comparația interlaboratoare menționată mai sus sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Coefficient de variație (%) pentru reproducibilitate (CV_R)

Material de referință	Aminoacid			
	Treonină	Cist(e)ină	Metionină	Lizină
Furaje mixte pentru porcine	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Furaj combinat 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 repetarea măsurătorilor pentru materialele de referință certificate, atunci când acestea sunt disponibile. Se recomandă calibrarea cu soluție de calibrare pentru aminoacid certificată.

9. Observații

9.1. Din cauza diferențelor dintre analizorii de aminoacizi, concentrațiile finale ale soluțiilor de calibrare pentru aminoacizii standard (a se vedea punctele 3.27.4 și 3.27.5) și pentru hidrolizat (a se vedea punctul 5.3.4) se consideră orientative.

Intervalul răspunsului liniar al aparatului trebuie verificat pentru toți aminoacizii.

Soluția etalon se diluează cu soluție tampon de citrat pentru a genera arii de vârf situate la mijlocul intervalului.

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

9.3. Prin aplicarea metodei la furajele combinate sau la preamestecurile care conțin peste 1 % clorură (concentrate, furaje minerale, furaje complementare) poate apărea o subestimare a metioninei, ceea ce necesită un tratament special.

10. Criterii de performanță

Compilarea rezultatelor (cu excepția tirozinei) care provin din cele două studii colaborative (din 1990 raportate la punctul 7 de mai sus și din 2005 raportate în SM SR EN ISO 13903:2012) oferă următoarele criterii de repetabilitate și reproductibilitate. Este posibil ca valorile obținute din aceste două studii interlaboratoare să nu fie aplicabile altor intervale de concentrație și matrice decât cele date.

10.1. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească:

- 6 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei, lizinei, prolinei, acidului glutamic, izoleucinei și histidinei;
- 8 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul treoninei, fenilalaninei, metioninei, acidului aspartic și leucinei;
- 10 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei și valinei;
- 12 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul serinei;
- 15 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei.

10.2. Reproductibilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească:

- 15 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei și treoninei;
- 20 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul lizinei, prolinei, fenilalaninei, metioninei și acidului aspartic;
- 22 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul acidului glutamic și leucinei;

- 27 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei;
- 32 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul izoleucinei;
- 35 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul valinei și serinei;
- 40 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul histidinei;
- 50 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei.

F. DETERMINAREA TRIPTOFANULUI

Metodele de analiză utilizate pentru determinarea triptofanului sunt:

- SM EN ISO 13904:2016 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de triptofan;
- metoda de analiză descrisă la punctele 1-9 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea în furaje a triptofanului total și liber. Ea nu face distincție între formele D și L.

2. Principiu

Pentru determinarea triptofanului total, eșantionul se hidrolizează în mediu bazic cu o soluție de hidroxid de bariu saturată și se încălzește la 110 °C timp de 20 de ore. După hidroliză, se adaugă etalon intern.

Pentru determinarea triptofanului liber, eșantionul se extrage în mediu ușor acid în prezența etalonului intern.

Triptofanul și etalonul intern din hidrolizat sau din extract se determină prin HPLC prin detectarea fluorescenței.

3. Reactivi

- 3.1. Se utilizează apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS/cm).
- 3.2. Substanță etalon: triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.

3.3. Substanță etalon intern: α -metil-triptofan (puritate/conținut $\geq 99\%$), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.

3.4. Hidroxid de bariu octahidratat (se evită expunerea excesivă la aer a $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ pentru a se evita formarea de BaCO_3 , care ar putea perturba determinarea) (a se vedea observația de la punctul 9.3).

3.5. Hidroxid de sodiu.

3.6. Acid ortofosforic, $g(g/g) = 85\%$.

3.7. Acid clorhidric, $\rho_{20} 1,19\text{ g/ml}$.

3.8. Metanol, de calitate HPLC.

3.9. Eter de petrol, interval de fierbere $40\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$.

3.10. Soluție de hidroxid de sodiu, $c = 1\text{ mol/l}$

Se dizolvă 40,0 g de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1).

3.11. Acid clorhidric, $c = 6\text{ mol/l}$:

Se iau 492 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.

3.12. Acid clorhidric, $c = 1\text{ mol/l}$:

Se iau 82 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.

3.13. Acid clorhidric, $c = 0,1\text{ mol/l}$:

Se iau 8,2 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă.

3.14. Acid ortofosforic, $c = 0,5\text{ mol/l}$:

Se iau 34 ml de acid ortofosforic (punctul 3.6) și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1).

3.15. Soluție concentrată de triptofan (punctul 3.2), $c = 2,50\text{ }\mu\text{mol/ml}$:

Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2553 g de triptofan (punctul 3.2) în acid clorhidric (punctul 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la $-18\text{ }^\circ\text{C}$ timp de maximum 4 săptămâni.

3.16. Soluție etalon intern concentrată, $c = 2,50\text{ }\mu\text{mol/ml}$:

Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2728 g de α -metil-triptofan (punctul 3.3) în acid clorhidric (punctul 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de maximum 4 săptămâni.

3.17. Soluție etalon de calibrare pentru triptofan și etalon intern:

Se iau 2,00 ml din soluția concentrată de triptofan (punctul 3.15) și 2,00 ml din soluția concentrată de etalon intern (α -metil-triptofan) (punctul 3.16). Se diluează cu apă (punctul 3.1) și metanol (punctul 3.8) până se ajunge la un volum aproximativ egal și la aproximativ aceeași concentrație de metanol (10-30 %) ca și hidrolizatul final.

Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

În timpul preparării se protejează de lumina solară directă.

3.18. Acid acetic

3.19. 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol.

3.20. Etanolamină g (g/g) > 98 %.

3.21. 1 g de soluție de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în 100 ml de metanol (punctul 3.8).

3.22. Fază mobilă pentru HPLC: 3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1).

4. *Aparatură*

4.1. Echipament de HPLC cu detector spectrofluorometric.

4.2. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, particule de 3 μm sau echivalent.

4.3. pH-metru.

4.4. Vas de polipropilenă, cu capacitate de 125 ml, cu gât larg și dop filetat.

4.5. Filtru cu membrană, 0,45 μm .

4.6. Autoclavă, 110 (± 2) $^{\circ}\text{C}$, 1.4 ($\pm 0,1$) bar.

4.7. Agitator mecanic sau magnetic.

4.8. Mixer Vortex.

5. *Procedura*

5.1. *Prepararea eșantioanelor*

Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.9).

5.2. *Determinarea triptofanului liber (extract)*

Se cântărește cu o abatere de 1 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer. Se adaugă 100,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.13) și 5,00 ml din soluția etalon intern concentrată (punctul 3.16). Se agită sau se amestecă timp de 60 de minute cu ajutorul unui agitator mecanic sau al unui amestecător magnetic (punctul 4.7). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator. Se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se ajustează pH-ul la valoarea 3 utilizând hidroxid de sodiu (punctul 3.10). Se adaugă suficient metanol (punctul 3.8) pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ același volum ca și soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)).

Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Soluția etalon și extractele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea extractelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile.

5.3. *Determinarea triptofanului total (hidrolizat)*

Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g din eșantionul preparat (punctul 5.1) într-un vas de polipropilenă (punctul 4.4). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă 8,4 g de hidroxid

de bariu octahidrat (punctul 3.4) și 10 ml de apă. Se amestecă într-un mixer Vortex (punctul 4.8) sau într-un amestecător magnetic (punctul 4.7). Magnetul învelit în teflon se lasă în amestec. Se spală pereții vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul filetat și se închide vasul neermetic. Se transferă într-o autoclavă (punctul 4.6) cu apă clocotită și se expun la vapori de apă timp de 30-60 de minute. Se închide autoclava și se autoclavează la $110 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ timp de 20 de ore.

Înainte de a deschide autoclava se reduce temperatura la o valoare imediat sub $100 ^\circ\text{C}$. Pentru a evita cristalizarea $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, se adaugă la amestecul cald 30 ml apă la temperatura camerei. Se agită sau se amestecă ușor. Se adaugă 2,00 ml din soluția etalon intern concentrată (α -metil-triptofan) (punctul 3.16). Se răcesc vasele într-o baie de apă/gheață timp de 15 minute.

Apoi, se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se menține vasul în baia de răcire și se neutralizează cu HCl (punctul 3.11) amestecând continuu, apoi se ajustează pH-ul la valoarea 3,0 utilizând HCl (punctul 3.12). Se adaugă suficient metanol pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la volumul definit necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu provoacă precipitare.

Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de $0,45 \mu\text{m}$ (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.

Soluția etalon și hidrolizatele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea hidrolizatelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la $5 ^\circ\text{C}$, cel mult 3 zile.

5.4. Determinarea prin HPLC

Următoarele condiții pentru eluția izocratică sunt oferite în scop orientativ; se pot aplica alte condiții cu condiția ca acestea să determine rezultate echivalente (a se vedea, de asemenea, observațiile de la punctele 9.1 și 9.2):

Cromatografie lichidă coloană (punctul 4.2):	125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , particule de $3 \mu\text{m}$ sau echivalent

Temperatura coloanei:	Temperatura camerei
Faza mobilă (punctul 3.22):	3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1)
Debit:	1 ml/min
Timpul total de desfășurare:	aprox. 34 de minute
Lungimea undei de detecție:	excitație: 280 nm, emisie: 356 nm.
Volum de injecție	20 μl

6. *Calculul rezultatelor*

Se calculează cantitatea de triptofan (X), în g per 100 g de eșantion.

$$X = \frac{A \ B \ V_1 \ c \ V_2 \ M}{C \ D \ V_3 \ 10000 \ m}$$

=aria vârfului etalonului intern, soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)

A

B=suprafața vârfului pentru triptofan, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3)

V₁=volumul în ml (2 ml) al soluției concentrate de triptofan (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17)

c=concentrația în μmol/ml (= 2,50) a soluției concentrate de triptofan (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17)

V₂=volumul în ml al soluției etalon intern concentrate (punctul 3.16) adăugată la extract (punctul 5.2) (= 5,00 ml) sau la hidrolizat (punctul 5.3) (= 2,00 ml)

C=aria vârfului etalonului intern, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3)

D=aria vârfului pentru triptofan, soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)

V_3 =volumul în ml (= 2,00 ml) al soluției de etalon intern concentrate (punctul 3.16) adăugată la soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)

m=greutatea eșantionului în g (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat și/sau degresat)

M = masa molară a triptofanului (= 204,23 g/mol).

7. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 10 % din rezultatul cel mai mare.

8. *Rezultatele unui studiu colaborativ*

S-a efectuat un studiu colaborativ la nivelul UE (a 4-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate trei eșantioane de către 12 laboratoare pentru a certifica metoda de hidroliză. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion 1	Eșantion 2	Eșantion 3
	Furaje pentru porcine	Furaje pentru porcine suplimentate cu L-triptofan	Furaje concentrate pentru porcine
L	12	12	12
n	50	55	50
Medie (g/kg)	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r (g/kg)	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9

S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s_r = deviația standard a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %			

S-a efectuat un alt studiu colaborativ la nivelul UE (a 3-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate două eșantioane de către 13 laboratoare pentru a certifica metoda de extracție a triptofanului liber. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion 4 Amestec de grâu cu soia	Eșantion 5 Amestec de grâu cu soia (= eșantion 4) adăugat cu triptofan (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Medie (g/kg)	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r (g/kg)	0,014	0,034

CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s_r = deviația standard a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %		

S-a efectuat un alt studiu de comparație interlaboratoare la nivelul UE în care au fost analizate patru eșantioane de către 7 laboratoare cu scopul de a certifica metoda de hidroliză pentru triptofan. Rezultatele sunt prezentate mai jos. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize.

	Eșantion 1 Furaje mixte pentru porcine (CRM 117)	Eșantion 2 Făină de pește cu conținut mic de grăsimi (CRM 118)	Eșantion 3 Făină din soia (CRM 119)	Eșantion 4 Lapte praf degresat (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Medie (g/kg)	2,064	8,801	6,882	5,236

s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r (g/kg)	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s_r = deviația standard a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %				

9. *Observații*

9.1. Respectarea următoarelor condițiile speciale de cromatografie poate conduce la o mai bună separare a triptofanului de α -metil-triptofan.

Eluție izocratică urmată de curățarea coloanei prin gradient:

Coloană pentru cromatografie lichidă:	125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , particule de 5 μ m sau echivalent
Temperatura coloanei:	32 °C
Fază mobilă:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metanol, 95 + 5 (V+V).

	B: Metanol	
Programul gradientului:	0 min 100 % A	0 % B
	15 min 100 % A	0 % B
	17 min	60 % A 40 % B
	19 min 60 % A	40 % B
	21 min 100 % A	0 % B
	33 min 100 % A	0 % B
Debit:	1,2 ml/min	
Timpul total de desfășurare:	aproximativ 33 de minute	

9.2. Cromatografia variază în funcție de tipul de HPLC și de materialul utilizat la umplerea coloanei. Sistemul ales trebuie să fie capabil să stabilească o separare inițială de referință între triptofan și etalonul intern. În plus, este important ca produșii de degradare să fie bine separați de triptofan și de etalonul intern. Se efectuează o operație de probă pe hidrolizate fără etalon intern pentru a verifica prezența impurităților la nivelul liniei de bază corespunzătoare etalonului intern. Este important ca durata eluției pentru toți produșii de degradare să fie suficient de lungă, altfel prezența unor vârfuri de eluție întârziate poate interfera cu operațiile ulterioare de cromatografie.

În cursul operațiilor, sistemul cromatografic oferă un răspuns linear. Acest răspuns linear se măsoară în condiții de concentrație constantă (normalul) a etalonului intern și de concentrații variabile a triptofanului. Este important că înălțimea vârfurilor pentru triptofan și pentru etalonul intern să se situeze în gama lineară a sistemului HPLC/fluorescență. Dacă vârfurile pentru triptofan și/sau pentru etalonul intern sunt prea joase sau prea înalte, analiza se repetă cu un eșantion de o altă dimensiune și/sau un volum final modificat.

9.3. *Hidroxid de bariu*

Cu timpul, hidroxidul de bariu devine mai dificil de dizolvat. Aceasta generează o soluție lipsită de limpezime pentru determinarea HPLC, ceea ce poate duce la rezultate slabe pentru triptofan.

G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ULEIURI ȘI GRĂSIMI BRUTE

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Prezenta metodă este destinată determinării în furaje a conținutului de uleiuri și grăsimi brute.

Utilizarea celor două proceduri descrise mai jos depinde de natura și compoziția furajului și de motivul efectuării analizei.

Pentru determinarea uleiurilor și grăsimilor brute din semințele oleaginoase și din fructele oleaginoase, precum și din hrana pentru animale în care conținutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracția trebuie efectuată prin procedura A și reextracția prin procedura B (punctul 5.3).

1.1. Procedura A – Uleiuri și grăsimi brute care pot fi extrase direct

Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine vegetală, cu excepția celor incluse în sfera de aplicare a procedurii B.

1.2. Procedura B – Uleiuri și grăsimi brute totale

Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine animală și tuturor furajelor combinate. Ea trebuie folosită pentru toate materiile din care uleiurile și grăsimile nu pot fi extrase complet fără hidroliză prealabilă (de exemplu, gluten, drojdie, proteine din cartofi și produse supuse unor procese cum ar fi extrudarea, transformarea în fulgi și încălzirea).

1.3. *Interpretarea rezultatelor*

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

2. *Principiu*

2.1. *Procedura A*

Eșantionul se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin distilare, iar reziduul se usucă și se cântărește.

2.2. Procedura B

Eșantionul 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 procedura 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, $c = 3 \text{ mol/l}$

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

4. Aparatură

4.1. Aparat de extracție. Dacă este dotat cu un sifon (aparat Soxhlet), rata refluxului este astfel încât să producă aproximativ 10 cicluri pe oră; dacă aparatul este de tip fără sifon, rata refluxului este de aproximativ 10 ml pe minut.

4.2. Cartușe de extracție, lipsite de materie solubilă în eter de petrol și cu o porozitate compatibilă cu cerințele de la punctul 4.1.

4.3. Cuptor de uscare, fie cu vid reglat la $75 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fie cu aer reglat la $100 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Procedura

5.1. Procedura A (a se vedea punctul 8.1)

Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, se transferă într-un cartuș de extracție (punctul 4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi.

Cartușul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) și se extrage timp de șase ore cu eter de petrol (punctul 3.1). Se colectează extractul de eter de petrol într-un vas uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce ([17](#)).

Solventul se îndepărtează prin distilare. Se usucă reziduul, păstrând vasul timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare (punctul 4.3). Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 de minute pentru a asigura că greutatea uleiurilor și grăsimilor rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg).

5.2. Procedura B

Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (a se vedea punctul 8.2), se introduc într-un pahar de laborator de 400 ml sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric (punctul 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 flaconul tip Erlenmeyer. Se aduce amestecul la fierbere ușoară deasupra unei flăcări mici sau pe o plită și se păstrează în această stare 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 (punctul 3.4) suficientă pentru a evita orice pierdere de ulei și grăsime în timpul filtrării. Se filtrează printr-un filtru de hârtie dublă, umezită și lipsită de grăsimi. Se spală reziduul în apă rece până se obține un filtrat neutru. Se verifică filtratul ca să nu conțină deloc uleiuri și grăsimi. Prezența acestora indică faptul că eșantionul trebuie extras cu eter de petrol, folosind procedura A, înainte de hidroliză.

Se așază filtrul de hârtie dublă care conține reziduul pe o sticlă de ceas și se usucă timp de o oră și jumătate în cuptorul cu aer (punctul 4.3) la 100 ± 3 °C.

Se așază filtrul de hârtie dublă care conține reziduul uscat într-un cartuș de extracție (punctul 4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartușul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) și se procedează astfel cum se indică la paragrafele doi și trei de la punctul 5.1.

5.3. Procedura A și reextragerea prin procedura B.

Pentru determinarea uleiurilor și grăsimilor brute din semințele oleaginoase și din fructele oleaginoase, precum și din hrana pentru animale în care conținutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracția trebuie efectuată prin procedura A și reextracția prin procedura B.

Aceasta înseamnă că, după extracția cu eter de petrol (procedura A), reziduul sau o porțiune din reziduu se reextrage cu acid clorhidric (procedura B). Conținutul de uleiuri și de grăsimi brute este suma rezultatelor procedurilor A și B.

6. Exprimarea rezultatului

Greutatea reziduului se exprimă ca procent din eșantion.

7. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același laborant nu depășește:

- 0,2 % în valoare absolută, pentru un conținut în uleiuri și grăsimi brute mai mic de 5 %;
- 4,0 % relativ la rezultatul cel mai mare pentru un conținut cuprins între 5 și 10 %;
- 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut mai mare de 10 %.

8. *Observații*

8.1. Pentru produse cu un conținut mare de uleiuri și grăsimi, care sunt dificil de măcinat sau care sunt improprii prelevării unui eșantion de testare redus omogen, se procedează după cum urmează.

Se cântăresc 20 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se amestecă cu o cantitate de 10 g sau mai mare de sulfat de sodiu anhidru (punctul 3.2). Se extrage cu eter de petrol (punctul 3.1) astfel cum se indică la punctul 5.1. Se completează extractul obținut până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.1) și se amestecă. Se iau 50 ml de soluție și se introduc într-un vas mic, uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce. Se elimină solventul prin distilare, se usucă și se procedează astfel cum se indică la ultimul paragraf al punctului 5.1.

Se elimină solventul din reziduul de extracție rămas în cartuș, se macină reziduul până la o finețe de 1 mm, se reintroduce în cartușul de extracție (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se procedează astfel cum se indică la punctul 5.1, paragrafele doi și trei.

Conținutul de uleiuri și grăsimi se calculează ca procent din eșantion folosind următoarea formulă:

$$(10 m_1 + m_2) \cdot 5 \text{ unde:}$$

m_1 = greutatea în grame a reziduului după prima extracție (parte alicotă din extract);

m_2 = greutatea în grame a reziduului după a doua extracție.

8.2. Pentru anumite produse (de exemplu, cu conținut mic de uleiuri și grăsimi) masa eșantionului de testat se poate mări.

8.3. Este posibil ca, înainte de hidroliză și extracție, hrana pentru animalele de companie cu conținut mare de apă să trebuiască să fie amestecată cu sulfat de sodiu anhidru, conform procedurii B.

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

8.5. Este posibil ca timpul de uscare de 1,5 h să necesite a fi prelungit pentru unele furaje. Uscarea excesivă se evită, întrucât acest fapt poate determina rezultate slabe. Se poate folosi, de asemenea, un cuptor cu microunde.

H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE FIBRE BRUTE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea în furaje a substanțelor organice lipsite de grăsimi care sunt insolubile în mediu acid și alcalin și care sunt descrise în mod convențional ca fibre brute.

Metoda nu se aplică în cazul lignocelulozei și al carbonului vegetal (particule prea fine).

2. Principiu

Eșantionul, degresat la nevoie, se tratează succesiv cu soluții de acid sulfuric și hidroxid de potasiu, de concentrații specifice, în stare de fierbere. Reziduul se separă prin filtrare printr-un filtru de sticlă sinterizată spălat, uscat, cântărit și calcinat la o temperatură cuprinsă între 475 și 500 °C. Pierderea de greutate rezultată prin calcinare corespunde fibrelor brute din eșantionul testat.

3. Reactivi

3.1. Acid sulfuric, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.

3.2. Agent antispumant (de exemplu n-octanol).

3.3. Agent de filtrare (Celite 545 sau echivalent), încălzit la 500 °C timp de patru ore (8.6).

3.4. Acetonă.

3.5. Eter de petrol cu interval de fierbere între 40 și 60 °C.

3.6. Acid clorhidric, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.7. Soluție de hidroxid de potasiu, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Aparatură

4.1. Unitate de încălzire pentru dizolvare cu acid sulfuric și soluție de hidroxid de potasiu, echipată cu un suport pentru creuzetul filtrant (punctul 4.2) și dotată cu un tub de evacuare prevăzut cu un dop la orificiul de ieșire pentru lichide și de creare de vid, posibil și cu aer comprimat. Înainte de fiecare utilizare zilnică, unitatea se preîncălzește cu apă aflată în stare de fierbere, timp de 5 minute.

4.2. Creuzet filtrant de sticlă cu placă filtrantă de sticlă sinterizată fuzionată, cu pori de 40-90 μm . Înainte de prima utilizare se încălzește la 500 °C timp de câteva minute, iar apoi se răcește (8.6).

4.3. Cilindru de cel puțin 270 ml cu condensator cu reflux, care poate fi supus fierberii.

4.4. Cuptor de uscare, cu termostat.

4.5. Cuptor cu muflă, cu termostat.

4.6. Unitate de extracție compusă dintr-o placă de sprijin pentru creuzetul filtrant (punctul 4.2) și cu o țevă de evacuare prevăzută cu un dop la orificiul de creare de vid și de ieșire a lichidelor.

4.7. Inele de conectare utilizate pentru a asambla unitatea de încălzire (punctul 4.1), creuzetul (punctul 4.2) și cilindrul (punctul 4.3), precum și pentru a conecta unitatea de extracție la rece (punctul 4.6) cu creuzetul.

5. Procedura

Se cântărește 1 g de eșantion preparat cu o abatere de 1 mg și se introduce în creuzet (punctul 4.2), (a se vedea observațiile 9.1, 9.2 și 9.3) și se adaugă 1 g de adjuvant de filtrare (punctul 3.3).

Se assemblează unitatea de încălzire (punctul 4.1) și creuzetul filtrant (punctul 4.2), apoi se atașează cilindrul (punctul 4.3) la creuzet. Se toarnă 150 ml de acid sulfuric aflat în stare de fierbere (punctul 3.1) în ansamblul cilindru-creuzet și, dacă este necesar, se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2).

Se aduce lichidul la fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute.

Se deschide dopul țevii de evacuare (punctul 4.1) și, în condiții de vid, se filtrează acidul sulfuric prin creuzetul filtrant, apoi se spală reziduul cu trei porții

consecutive de 30 ml de apă aflată în stare de fierbere, asigurându-se că reziduul se filtrează uscat după fiecare spălare.

Se închide dopul orificiului de evacuare și se toarnă 150 ml de soluție de hidroxid de potasiu aflată în stare de fierbere (punctul 3.7) în ansamblul cilindru-creuzet, apoi se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2). Se aduce lichidul la punctul de fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute. Se filtrează și se repetă procedura de spălare utilizată în etapa cu acid sulfuric.

După spălarea și uscarea finală, se deconectează creuzetul împreună cu conținutul său și se reconectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6). Se creează vidul, iar reziduul se spală în creuzet cu trei porții consecutive de acetonă de 25 ml (punctul 3.4), asigurându-se că reziduul se filtrează în starea uscată după fiecare spălare.

Creuzetul se usucă în cuptor la 130 °C până se ajunge la o greutate constantă. După fiecare uscare, se răcește în desicator și se cântărește rapid. Se introduce creuzetul într-un cuptor cu muflă și se calcinează până se atinge o greutate constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 2 mg) la o temperatură cuprinsă între 475 °C și 500 °C timp de cel puțin 30 de minute.

După fiecare încălzire, înainte de cântărire se răcește mai întâi în cuptor, iar apoi în desicator.

Se efectuează un test martor fără eșantion. Pierderea de greutate rezultată din calcinare nu trebui să depășească 4 mg.

6. *Calculul rezultatelor*

Conținutul de fibre brute exprimat ca procent din eșantion este dat de formula:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) 100}{m} \quad \text{unde:}$$

m = greutatea eșantionului în g;

m_0 = pierderea de greutate după calcinare în cursul determinării, în g;

m_1 = pierderea de greutate după calcinare în cursul testului martor, în g.

7. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

- 0,6 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;
- 6 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

8. Reproducibilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească:

- 1,0 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;
- 10 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

9. Observații

9.1. Furajele care au conținut de grăsimi brute mai mare de 10 % trebuie să fie degresate înainte de a fi supuse analizei cu eter de petrol (punctul 3.5). Creuzetul filtrant (punctul 4.2) împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6) și se creează vidul, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de eter de petrol de 30 ml, asigurându-se că reziduul este uscat. Creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de încălzire (punctul 4.1) și se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.

9.2. Furajele care conțin grăsimi care nu pot fi extrase direct cu eter de petrol (punctul 3.5) trebuie degresate astfel cum se indică la punctul 8.1 și degresate încă o dată după fierbere cu acid. După fierbere cu acid și spălare consecutivă, creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6), apoi se spală de trei ori cu 30 ml acetonă, urmat de trei spălări suplimentare cu porții de eter de petrol de 30 ml. Se filtrează sub vid până la uscare, iar analizarea se continuă astfel cum se descrie la punctul 5, începând cu tratamentul cu hidroxid de potasiu.

9.3. Dacă furajul conține mai mult de 5 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu, se conectează creuzetul (punctul 4.2) împreună cu eșantionul cântărit la unitatea de încălzire (punctul 4.1). Eșantionul se spală de trei ori cu 30 ml acid clorhidric (punctul 3.6). După fiecare adăugare, se lasă eșantionul să stea timp de aproximativ un minut înainte de filtrare. Se spală o singură dată cu 30 ml apă, iar apoi se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.

9.4. Dacă se utilizează aparatură în formă de stativ (o serie de creuzete atașate la aceeași unitate de încălzire) nu se efectuează două determinări individuale pe același eșantion de analizat în aceeași serie.

9.5. Dacă după fierbere este dificil să se filtreze soluțiile acide și alcaline, se utilizează aer comprimat introdus prin țeava de evacuare a unității de încălzire și apoi se continuă filtrarea.

9.6. Temperatura de calcinare nu depășește 500 °C pentru a se putea prelungi timpul de utilizare a sticlei creuzetului filtrant. Trebuie acordată atenție pentru a se evita șocurile termice excesive în cursul ciclurilor de încălzire și răcire.

I. DETERMINAREA ZAHARURILOR

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea cantității de zaharuri reductoare și a zaharurilor totale după inversie, exprimate ca glucoză sau, acolo unde este cazul, ca zaharoză, prin conversie cu factorul 0,95. Ea este aplicabilă furajelor combinate. Pentru alte tipuri de furaje există metode specifice. Dacă este necesar, lactoza se determină separat, ținându-se cont de aceasta la calcularea rezultatelor.

Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de zahăr utilizat la calcularea valorii energetice a furajului.

În cazul în care conținutul de zahăr trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză.

2. Principiu

Zaharurile se extrag în etanol diluat; soluția se limpezește cu soluții Carrez I și II. După eliminarea etanolului, cantitățile pre- și post-inversie se determină prin metoda Luff-Schoorl.

3. Reactivi

3.1. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C, neutralizată cu fenolftaleină.

3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Metiloranj, soluție 0,1 % (greutate/volum).

3.5. Acid clorhidric 4 mol/litru.

3.6. Acid clorhidric 0,1 mol/litru.

3.7. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru.

3.8. Reactiv Luff-Schoorl:

Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.8.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.8.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.8.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează.

Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru), a se vedea (punctul 5.4) ultimul paragraf. pH-ul soluției este aproximativ 9,4.

3.8.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, Cu SO₄ 5H₂O, lipsită de fier, în 100 ml apă.

3.8.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, C₆H₈O₇•H₂O, în 50 ml de apă.

3.8.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească.

3.9. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.

3.10. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare.

3.11. Acid sulfuric 3 mol/litru.

3.12. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum).

3.13. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate.

3.14. 3-metilbutan-1-ol.

4. *Aparatură*

Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.

5. Procedura

5.1. Extracția eșantionului

Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 200 ml etanol (punctul 3.1) și se amestecă timp de o oră în agitator. Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde. Se adaugă aproximativ 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din nou timp de un minut. Se completează până la volum cu etanolul (punctul 3.1), se omogenizează și se filtrează. Se îndepărtează 200 ml de filtrat și se evaporă până la aproximativ jumătate din volum în scopul eliminării majorității etanolului. Reziduul rămas după evaporare se transferă cantitativ într-un balon gradat de 200 ml cu ajutorul apei calde, se răcește, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și, dacă este necesar, se filtrează. Această soluție se va utiliza pentru determinarea cantității zaharurilor reductoare și, după inversie, a zaharurilor totale.

5.2. Determinarea zaharurilor reductoare

Cu ajutorul unei pipete se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă sub formă de conținut procentual de glucoză în eșantion.

5.3. Determinarea zaharurilor totale după inversie

Cu ajutorul unei pipete se recoltează 50 ml de soluție și se transferă într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă câteva picături de soluție de metiloranj (punctul 3.4), apoi, amestecând continuu, se adaugă cu grijă acid clorhidric (punctul 3.5) până când lichidul virează într-un roșu bine definit. Se adaugă 15 ml de acid clorhidric (punctul 3.6), se scufundă balonul într-o baie de apă clocotindă și se menține acolo timp de 30 de minute. Se răcește rapid la aproximativ 20 °C și se adaugă 15 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.7). Se completează cu apă până la 100 ml și se omogenizează. Se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă în procente de glucoză sau, dacă este cazul, de zaharoză, prin multiplicare cu factorul 0,95.

5.4. Titrare prin metoda Luff-Schoorl

Cu ajutorul unei pipete se recoltează 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) și se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml; se adaugă exact 25 ml din soluția de zaharuri limpezită. Se adaugă 2 granule de piatră ponce (punctul 3.13), se încălzește, amestecând manual, deasupra unei flăcări libere cu înălțime medie, aducându-se lichidul la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează:

Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.9) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.10) și încheind titrarea.

Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11), fără a se fierbe.

6. *Calculul rezultatelor*

Utilizând tabelul, se stabilește cantitatea de glucoză în mg care corespunde diferenței dintre valorile celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

7. *Proceduri speciale*

7.1. În cazul furajelor bogate în melase și al altor furaje care nu sunt în mod particular omogene, se cântăresc 20 g și se introduc, împreună cu 500 ml de apă, într-un balon gradat de 1 litru. Se amestecă timp de o oră în agitator. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul 3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1, utilizând, de data aceasta, o cantitate de patru ori mai mare din fiecare reactiv. Se completează până la volum cu etanol 80 % (v/v).

Se omogenizează și se filtrează. Se elimină etanolul astfel cum se descrie la punctul 5.1. În absența amidonului dextrinizat, se completează până la volum cu apă distilată.

7.2. În cazul melaselor și al materiilor prime pentru furaje bogate în zaharuri și cvasi lipsite de amidon (roșcove, fulgi de rădăcină de sfeclă uscați etc.), se cântăresc 5 g, se introduc într-un balon gradat de 250 ml, se adaugă 200 ml apă distilată și se amestecă în agitator timp de o oră sau, dacă este necesar, mai mult. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul 3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1. Se completează până la volum cu apă rece, se omogenizează și se filtrează. Pentru determinarea cantității totale de zaharuri, se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.3.

8. *Observații*

8.1. În scopul prevenirii formării de spumă este recomandabil să se adauge (indiferent de volum) aproximativ 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (punctul 3.14) înainte de fierbere cu reactiv Luff-Schoorl.

8.2. Diferența dintre conținutul total de zaharuri după inversie exprimat ca glucoză și conținutul de zaharuri reductoare exprimat ca glucoză, multiplicată cu 0,95, reprezintă conținutul procentual de zaharoză.

8.3. Pentru a determina conținutul de zaharuri reductoare, cu excepția lactozei, se pot adopta două metode:

8.3.1. Pentru un calcul aproximativ, conținutul de lactoză stabilit printr-o metodă de analiză diferită se multiplică cu 0,675, iar rezultatul obținut se scade din conținutul de zaharuri reductoare.

8.3.2. Pentru un calcul precis al zaharurilor reductoare, cu excepția lactozei, se utilizează același eșantion în cele două determinări finale. Una dintre analize se efectuează pe o parte din soluția obținută în conformitate cu punctul 5.1, alta pe o parte din soluția obținută în cursul determinării lactozei prin metoda stabilită în acest sens (după fermentarea celorlalte tipuri de zaharuri și limpezire).

În ambele cazuri, cantitatea de zaharuri prezentă se determină prin metoda Luff-Schoorl și se calculează în mg de glucoză. Una dintre valori se scade din cealaltă, iar diferența se exprimă ca procent din eșantion.

Exemplu

Cele două volume considerate corespund, pentru fiecare determinare, unui eșantion de 250 mg.

În primul caz, se consumă 17 ml de soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru, ceea ce corespunde la 44,2 mg de glucoză; în al doilea, 11 ml, ceea ce corespunde la 27,6 mg de glucoză.

Diferența este 16,6 mg de glucoză.

Prin urmare, conținutul de zaharuri reductoare (cu excepția lactozei), calculat ca glucoză, este:

$$\frac{416,6}{10} = 6,64\%$$

Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl

ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, 2 minute încălzire, 10 minute fierbere

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru
ml	mg	diferență	mg	diferență	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12

13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. DETERMINAREA LACTOZEI

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Această metodă permite determinarea conținutului de lactoză în furajele care au un conținut de lactoză mai mare de 0,5 %.

2. *Principiu*

Zaharurile se dizolvă în apă. Soluția este supusă fermentației de către drojdia *Saccharomyces cerevisiae* care nu descompune lactoza. După limpezire și filtrare, conținutul de lactoză al filtratului se determină prin metoda Luff-Schoorl.

3. *Reactivi*

3.1. Suspensie de *Saccharomyces cerevisiae*: se suspendă 25 g de drojdie proaspătă în 100 ml de apă. Suspensia se păstrează în frigider o perioadă de maximum o săptămână.

3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Reactiv Luff-Schoorl:

Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.4.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.4.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.4.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează. Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na_2CO_3 1 mol/litru). pH-ul soluției este aproximativ 9,4.

3.4.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, lipsită de fier, în 100 ml apă.

3.4.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, în 50 ml de apă.

3.4.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească.

3.5. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate.

3.6. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum).

3.7. Acid sulfuric 3 mol/litru.

3.8. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.

3.9. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare.

4. *Aparatură*

Baie de apă cu termostat reglat la 38-40 °C.

5. *Procedura*

Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduce într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25-30 ml de apă. Balonul se introduce într-o baie de apă aflată la temperatura de fierbere, timp de 30 de minute, apoi se răcește la aproximativ 35 °C. Se adaugă 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1) și se omogenizează. Balonul se lasă să stea timp de două ore într-o baie de apă la temperatura de 38-40 °C. Se răcește la aproximativ 20 °C.

Se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din

nou timp de 30 de secunde. Se completează cu apă până la 100 ml, se amestecă și se filtrează. Cu ajutorul unei pipete, se îndepărtează o cantitate de filtrat care nu depășește 25 ml și care conține, de preferință, 40-80 mg de lactoză, apoi se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml. Dacă este necesar, se completează cu apă până la 25 ml.

Se efectuează un test martor în același mod cu 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1). Se determină conținutul de lactoză prin metoda Luff-Schoorl, după cum urmează: se adaugă exact 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) și două granule de piatră ponce (punctul 3.5). Se amestecă manual concomitent cu încălzirea deasupra unei flăcări libere de înălțime medie, iar lichidul se aduce la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează:

Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml acid sulfuric (punctul 3.7). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.8) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.9) și încheind titrarea.

Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.7), fără a se fierbe.

6. *Calculul rezultatelor*

Utilizând tabelul atașat, se stabilește cantitatea de lactoză în mg care corespunde diferenței dintre rezultatele celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru.

Rezultatul pentru lactoza anhidră se exprimă ca procent din eșantion.

7. *Observație*

1. Pentru produsele care conțin mai mult de 40 % zahăr fermentescibil, se utilizează mai mult de 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1).

2. În hrana „cu conținut redus de lactoză” (de exemplu, laptele pentru pisici), lactoza este convertită în fructoză, care nu este complet fermentată în decurs de două ore, ceea ce duce la rezultate pozitive mai mari sau false (deoarece reziduurile de fructoză rămân în extract).

Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl

ml de $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru, două minute încălzire, 10 minute fierbere

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lactoză $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/litru
ml	mg	diferență	mg	diferență	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15

16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. DETERMINAREA AMIDONULUI

METODA POLARIMETRICĂ

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de amidon și a produselor de degradare a amidonului cu masă moleculară mare cu scopul de a se verifica conformitatea cu valoarea energetică declarată (prevederile din anexa nr. 7) și cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de amidon utilizat la calcularea valorii energetice a furajului.

În cazul în care conținutul de amidon trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză.

2. Principiu

Metoda cuprinde două determinări. În prima, eșantionul este tratat cu acid clorhidric diluat. După limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică a soluției prin polarimetrie.

În cea de-a doua, eșantionul este extras cu etanol 40 %. După acidificarea filtratului cu acid clorhidric, limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică la fel ca în prima determinare.

Diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut, oferă conținutul de amidon al eșantionului.

3. Reactivi

3.1. Acid clorhidric, soluție cu concentrație 25 % (g/g): 1,126 g/ml.

3.2. Acid clorhidric, soluție 1,13 % (greutate/volum)

Concentrația se verifică prin titrare folosind o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru în prezența roșului de metil 0,1 % (greutate/volum) în etanol 94 % (v/v). Pentru neutralizarea a 10 ml sunt necesari 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/litru.

3.3. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.5. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C.

4. Aparatură

4.1. Flacon Erlenmeyer de 250 ml cu îmbinare de sticlă șlefuită standard și cu condensator cu reflux.

4.2. Polarimetru sau zaharimetru.

5. Procedura

5.1. Pregătirea eșantionului

Eșantionul se zdrobește până când devine suficient de fin pentru a trece complet printr-o sită cu orificii rotunde de 0,5 mm.

5.2. Determinarea rotației optice totale (P sau S) (a se vedea observația de la punctul 7.1)

Se cântăresc 2,5 g din eșantionul zdrobit cu abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2), se agită pentru a obține o distribuție uniformă a eșantionului de testat și se adaugă încă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se scufundă balonul într-o baie de apă care fierbe, agitându-se cu putere și în mod constant în primele trei minute pentru a preveni formarea de aglomerări. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere atunci când balonul este introdus în

ea. Balonul nu trebuie să fie scos din baie în timp ce este agitat. După exact 15 minute, se scoate din baie, se adaugă 30 ml de apă rece și se răcește imediat la 20 °C.

Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.3) și se agită timp de aproximativ 30 de secunde. Apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.4) și se agită din nou timp de aproximativ 30 de secunde. Se completează cu apă până la volum, se amestecă și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect limpede (ceea ce se întâmplă rar), se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare din soluțiile Carrez I și II, de exemplu 10 ml.

Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetrul sau cu zaharimetrul.

5.3. *Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în etanol 40 %*

Se cântăresc 5 g din eșantion cu abatere de 1 mg, se introduc într-un balon gradat de 100 ml și se adaugă aproximativ 80 ml de etanol (punctul 3.5) (a se vedea observația de la punctul 7.2). Se lasă balonul să stea timp de 1 oră la temperatura camerei; în acest timp, se agită cu putere de șase ori astfel încât eșantionul de testat să se amestece complet cu etanolul. Se completează până la volum cu etanol (punctul 3.5), se amestecă și se filtrează.

Se pipetează 50 ml de filtrat (corespunde la 2,5 g de eșantion) într-un flacon Erlenmeyer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) și se agită puternic. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux, iar vasul se scufundă într-o baie de apă în fierbere. După exact 15 minute, se scoate flaconul Erlenmeyer din baie, se transferă conținutul într-un balon gradat de 100 ml, clătind cu puțină apă rece și se răcește la 20 °C.

Se limpezește folosind soluțiile Carrez I (punctul 3.3) și II (punctul 3.4), se completează până la volum cu apă, se amestecă, se filtrează și se măsoară rotația optică astfel cum se indică la punctul 5.2 paragrafele doi și trei.

6. Calculul rezultatelor

Conținutul de amidon (%) se calculează după cum urmează:

6.1. *Măsurare cu polarimetrul*

$$\text{Continut de amidon (\%)} = \frac{2000 (P - P')}{[\alpha]_D^{20}} \quad \begin{array}{l} \text{=rotația optică totală în} \\ \text{grade unghiulare} \end{array}$$

P

P'=rotația optică în grade unghiulare a substanțelor solubile în etanol 40 % (V/V)

$[\alpha]_D^{20}$ =rotația optică specifică a amidonului pur. Valorile numerice acceptate în mod convențional pentru acest factor sunt următoarele:

+ 185,9° : amidon din orez

+ 185,7° : amidon din cartofi

+ 184,6° : amidon din porumb

+ 182,7° : amidon din grâu

+ 181,5° : amidon din orz

+ 181,3° : amidon din ovăz

+ 184,0 :alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon în furaje combinate

6.2. *Măsurare cu zaharimetrul*

$$(\%) = \frac{2000 (2N - 0,665) (S - S')}{[\alpha]_D^{20} \cdot 100} - \frac{26,6N (S - S')}{[\alpha]_D^{20}} \quad \begin{array}{l} \text{=rotația optică} \\ \text{totală în grade} \\ \text{zaharimetrice} \end{array}$$

S

S'=rotația optică în grade zaharimetrice a substanțelor solubile în etanol 40 % (v/v)

N=greutatea (g) a zaharozei în 100 ml de apă determinând o rotație optică de 100 grade zaharimetrice măsurată cu un tub de 200 mm

16,29 g pentru zaharimetrele franceze

26,00 g pentru zaharimetrele germane

20,00 g pentru zaharimetrele mixte.

$[\alpha]_D^{20}$ =rotația optică specifică a amidonului pur (a se vedea punctul 6.1)

6.3. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,4 în valoare absolută pentru un conținut de amidon mai mic de 40 % și 1 % în valoare relativă în cazul conținutului de amidon egal sau mai mare de 40 %.

7. Observații

7.1. În cazul în care eșantionul conține mai mult de 6 % carbonați, calculați sub formă de carbonat de calciu, aceștia trebuie distruși prin tratare cu o cantitate perfect adecvată de acid sulfuric diluat înaintea determinării rotației optice totale.

7.2. În cazul produselor cu un conținut mare de lactoză, cum ar fi zerul praf sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează după adăugarea a 80 ml etanol (punctul 3.5). La balon se fixează un condensator cu reflux, iar balonul se scufundă într-o baie de apă la 50 °C timp de 30 de minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza astfel cum se indică la punctul 5.3.

7.3. În cazul în care sunt prezente în cantități semnificative în furaje, următoarele materii prime furajere sunt cunoscute ca dând naștere la interferențe atunci când conținutul de amidon se determină prin metoda polarimetrică și, din acest motiv, se pot obține rezultate incorecte:

— produse din sfeclă (de zahăr), precum pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), vinasă de sfeclă (de zahăr), zahăr (din sfeclă);

— pulpă de citrice;

— semințe de in; șrot de semințe de in; șrot de semințe de in rezultat după extracție;

— semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță rezultat după extracție; coji de semințe de rapiță;

— semințe de floarea soarelui; șrot de semințe de floarea soarelui rezultat după extracție; semințe de floarea soarelui parțial decorticate, rezultate după extracție;

— șrot de copra; șrot de copra rezultat după extracție;

— pulpă de cartofi;

— drojdie deshidratată;

— produse bogate în inulină (de exemplu, fulgi și făină de topinambur);

— jumări;

— produse din soia

În aceste cazuri, se poate aplica metoda de analiză prevăzută și utilizată și pentru furajele care conțin mai puțin de 1 % amidon.

L. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CENUȘĂ BRUTĂ

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de cenușă brută.

2. Principiu

Eșantionul se calcinează la 550 °C; reziduul se cântărește.

3. Reactivi

Nitrat de amoniu, soluție 20 % (greutate/volum).

4. Aparatură

4.1. Plită.

4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat.

4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm).

5. Procedura

Se cântăresc aproximativ 5 g de eşantion cu o abatere de 1 mg (2,5 g pentru produsele cu tendință de umflare) și se introduc într-un creuzet pentru calcinare, care în prealabil a fost încălzit la 550 °C, răcit și tarat. Se așază creuzetul pe plită și se încălzește progresiv până la carbonizarea materialului. Se calcinează în conformitate cu mențiunile de la punctul 5.1 sau 5.2.

5.1. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se menține la această temperatură până la obținerea unei cenuși albe, gri deschis sau roșiatice, aparent lipsită de particule carbonizate. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat.

5.2. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se calcinează timp de 3 ore. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat. Se calcinează din nou timp de 30 de minute pentru

a asigura că greutatea cenușii rămâne constantă (pierdere de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg).

6. *Calculul rezultatelor*

Se calculează greutatea reziduuului prin deducerea tarei.

Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

7. *Observații*

7.1. Cenușa *substanțelor dificil de calcinat* trebuie supusă unei calcinări inițiale timp de cel puțin trei ore, urmată de răcire și de adăugarea câtorva picături de soluție de nitrat de amoniu 20 % sau de apă (cu grijă, pentru a evita dispersarea cenușii și formarea de aglomerări). Se continuă calcinarea după uscarea în cuptor. Operația se repetă până când calcinarea este completă.

7.2. În cazul *substanțelor rezistente la tratamentul* descris la punctul 7.1, se procedează în felul următor: după calcinare timp de trei ore, se introduce cenușa în apă caldă și se filtrează printr-un filtru mic, lipsit de cenușă. Filtrul și conținutul său se calcinează în creuzetul inițial. Filtratul se introduce în creuzetul răcit, se evaporă până la uscare, se calcinează și se cântărește.

7.3. În cazul *uleiurilor și grăsimilor*, se cântăresc cu precizie 25 g de eșantion într-un creuzet de dimensiuni adecvate. Se carbonizează prin aprinderea materialului cu ajutorul unei benzi de filtru de hârtie, lipsit de cenușă. După combustie, se umectează cu cât mai puțină apă. Se usucă și se calcinează astfel cum se descrie la punctul 5.

M. DETERMINAREA CENUȘII INSOLUBILE ÎN ACID CLORHIDRIC

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de substanțe minerale insolubile în acid clorhidric. Se pot utiliza două metode, în funcție de natura eșantionului.

1.1. *Metoda A*: aplicabilă materiilor prime furajere organice furaje și majorității furajelor combinate;

1.2. *Metoda B*: aplicabilă compușilor și amestecurilor minerale, precum furajelor combinate al căror conținut de substanțe insolubile în acid clorhidric, determinat conform metodei A, este mai mare de 1 %.

2. *Principiu*

2.1. *Metoda A*: eşantionul se calcinează, cenuşa se fierbe în acid clorhidric, iar reziduul insolubil se filtrează şi se cântăreşte.

2.2. *Metoda B*: eşantionul se tratează cu acid clorhidric. Soluţia se filtrează, reziduul se calcinează, iar cenuşa astfel obţinută se tratează conform metodei A.

3. **Reactivi**

3.1. Acid clorhidric 3 mol/litru.

3.2. Acid tricloracetic, soluţie 20 % (greutate/volum).

3.3. Acid tricloracetic, soluţie 1 % (greutate/volum).

4. **Aparatură**

4.1. Plită.

4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat.

4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porţelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ $60 \times 40 \times 25$ mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălţime: 20-40 mm).

4.4. Filtre lipsite de cenuşă

5. **Procedura**

5.1. **Metoda A:**

Eşantionul se calcinează prin metoda descrisă la determinarea cenuşii brute. Se poate utiliza şi cenuşă obţinută din analiza respectivă.

Se introduce cenuşa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se aduce lent la fierbere şi se fierbe încet timp de 15 minute. Soluţia caldă se filtrează printr-un filtru de hârtie lipsit de cenuşă, iar reziduul se spală cu apă caldă până când reacţia acidă nu mai este vizibilă. Filtrul care conţine reziduul se usucă şi se calcinează într-un creuzet tarat, la o temperatură de minimum 550 °C şi maximum 700 °C. Se lasă să se răcească într-un desicator şi se cântăreşte.

5.2. **Metoda B**

Se cântăresc 5 g de eşantion cu o abatere de 1 mg şi se introduc într-un pahar de laborator de 250-400 ml. Se adaugă succesiv 25 ml apă şi 25 ml acid clorhidric (punctul 3.1), se amestecă şi se aşteaptă ca efervescenţa să înceteze. Se adaugă încă 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se aşteaptă ca degajarea de gaz să înceteze,

apoi se introduce paharul de laborator într-o baie de apă la temperatura de fierbere și se menține acolo timp de 30 de minute sau, dacă este necesar, mai mult, pentru ca amidonul eventual prezent să se hidrolizeze complet. Se filtrează până este încă cald, printr-un filtru lipsit de cenușă, iar filtrul se spală în 50 ml de apă caldă (a se vedea observația 7). Se introduce filtrul care conține reziduul într-un creuzet pentru calcinare, se usucă și se calcinează la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1); se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.1, al doilea paragraf.

6. *Calculul rezultatelor*

Se calculează greutatea reziduului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

7. *Observație*

Dacă filtrarea se dovedește dificilă, se reia analiza, înlocuind cei 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) cu 50 ml de acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum) (punctul 3.2) și spălând filtrul într-o soluție caldă de acid tricloracetic 1 % (punctul 3.3).

N. DETERMINAREA FOSFORULUI TOTAL

Fosforul total se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES; sau

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 15621:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau

— metoda fotometrică, astfel cum este descrisă în continuare.

METODA FOTOMETRICĂ

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de fosfor total. Ea este indicată în special pentru analiza produselor sărace în fosfor. În anumite cazuri (produs bogat în fosfor), se poate utiliza o metodă gravimetrică.

2. Principiu

Eșantionul se mineralizează, fie prin combustie uscată (în cazul furajelor organice), fie prin dizolvare în mediu acid (în cazul furajelor combinate conținând minerale și al celor lichide), iar apoi se introduce în soluție acidă. Soluția se tratează cu reactivul molibdovanadat. Densitatea optică a soluției galbene astfel formate se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm.

3. Reactivi

3.1. Carbonat de calciu.

3.2. Acid clorhidric, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (aproximativ 6 mol/litru).

3.3. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,38-1,42$ g/ml.

3.5. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.6. Reactiv molibdovanadat: se amestecă 200 ml de soluție de heptamolibdat de amoniu (punctul 3.6.1), 200 ml de soluție de monovanadat de amoniu (punctul 3.6.2) și 134 ml de acid azotic (punctul 3.4) într-un balon gradat de 1 litru. Se completează până la volum cu apă.

3.6.1. Soluție de heptamolibdat de amoniu: se dizolvă în apă fierbinte 100 g de heptamolibdat de amoniu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Se adaugă 10 ml de amoniac (concentrație 0,91 g/ml) și se completează cu apă până la 1 litru.

3.6.2. Soluție de monovanadat de amoniu: se dizolvă 2,35 g de monovanadat de amoniu NH_4VO_3 în 400 ml de apă fierbinte. Amestecând constant, se adaugă lent 20 ml de acid azotic diluat [7 ml de HNO_3 (punctul 3.4) + 13 ml de H_2O] și se completează cu apă până la 1 litru.

3.7. Soluție etalon de 1 mg de fosfor per ml: se dizolvă 4,387 g de fosfat diacid de potasiu KH_2PO_4 în apă. Se completează cu apă până la 1 litru.

4. Aparatură

4.1. Creuzete pentru calcinare din silice, porțelan sau platină.

4.2. Cuptor cu muflă electric, dotat cu termostat reglat la 550 °C.

4.3. Flacon Kjeldahl de 250 ml.

4.4. Baloane gradate și pipete de precizie.

4.5. Spectrofotometru.

4.6. Eprubete cu diametru de aproximativ 16 mm, cu dopuri gradate la un diametru de 14,5 mm; capacitate: 25-30 ml.

5. Procedura

5.1. *Prepararea soluției*

În funcție de natura eșantionului, soluția se prepară astfel cum se indică la punctul 5.1.1 sau 5.1.2.

5.1.1. Procedura uzuală

Se cântărește 1 g de eșantion, sau mai mult, cu o abatere de 1 mg. Se introduce eșantionul de testat într-un flacon Kjeldahl, se adaugă 20 ml de acid sulfuric (punctul 3.5), se agită pentru a impregna complet substanța cu acid și pentru a preveni ca substanța să adere pe pereții flaconului, se încălzește și se menține la punctul de fierbere timp de 10 minute. Se lasă să se răcească ușor, se adaugă 2 ml de acid azotic (punctul 3.4), se încălzește ușor, se lasă să se răcească ușor, se mai adaugă puțin acid azotic (punctul 3.4) și se readuce la punctul de fierbere. Se repetă această procedură până se obține o soluție incoloră. Se răcește, se adaugă puțină apă, se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml clătind flaconul Kjeldahl cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează.

5.1.2. Eșantioane care conțin substanțe organice și sunt lipsite de fosfați diacizi de calciu și magneziu

Se cântăresc aproximativ 2,5 g de eșantion cu abatere de 1 mg într-un creuzet de calcinare. Se amestecă eșantionul de testat cu 1 g de carbonat de calciu (punctul 3.1) până când se obține un amestec complet omogen. Se calcinează în cuptor la 550 °C până se obține o cenușă albă sau gri (o cantitate mică de cărbune se ignoră). Se transferă cenușa într-un pahar de laborator de 250 ml. Se adaugă 20 ml de apă și acid clorhidric (punctul 3.2) până când efervescența încetează. Se adaugă încă 10 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se așază paharul de laborator pe o baie de nisip și se evaporă până la uscare, pentru a face silica insolubilă. Se redizolvă reziduul în 10

ml de acid azotic (punctul 3.3) și se fierbe pe baia de nisip sau pe o plită timp de 5 minute, fără a se evapora până la uscare. Se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml, clătind paharul de mai multe ori cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează.

5.2. *Apariția colorației și măsurarea densității optice*

Se diluează o parte alicotă de filtrat obținut ca la punctul 5.1.1 sau 5.1.2 pentru a obține o concentrație de fosfor de maximum 40 $\mu\text{g/ml}$. Se introduc 10 ml din această soluție într-o eprubetă (punctul 4.6) și se adaugă 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm, prin comparație cu o soluție obținută prin adăugarea de 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6) la 10 ml de apă.

5.3. *Curba de calibrare*

Din soluția etalon (punctul 3.7) se prepară soluții care conțin 5, 10, 20, 30 și 40 μg de fosfor per ml, respectiv. Se iau 10 ml din fiecare din aceste soluții și se adaugă la 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară astfel cum se indică la punctul 5.2. Se trasează curba de calibrare prin înscrierea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile corespunzătoare de fosfor. Pentru concentrații cuprinse între 0 și 40 $\mu\text{g/ml}$, curba va fi liniară.

6. Calculul rezultatelor

Cantitatea de fosfor din eșantionul de testat se determină prin utilizarea curbei de calibrare.

Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion.

Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășesc:

- 3 %, relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fosfor mai mic de 5 %;
- 0,15 % în valoare absolută, pentru un conținut de fosfor egal sau mai mare de 5 %.

O. DETERMINAREA CLORULUI DIN CLORURI

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea cantității de clor din clorurile solubile în apă, exprimate convențional ca clorură de sodiu. Este aplicabilă tuturor furajelor.

2. Principiu

Clorurile se dizolvă în apă. Dacă produsul conține materii organice, se limpezește. Soluția se acidifică ușor cu acid azotic, iar clorurile precipită sub formă de clorură de argint cu ajutorul unei soluții de nitrat de argint. Excesul de nitrat de argint se titrează cu o soluție de tiocianat de amoniu, prin metoda Volhard.

3. Reactivi

3.1. Soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/litru.

3.2. Soluție de nitrat de argint 0,1 mol/litru.

3.3. Soluție saturată de sulfat feric de amoniu $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.

3.4. Acid azotic, concentrație: 1,38 g/ml.

3.5. Eter dietilic.

3.6. Acetonă.

3.7. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.8. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.9. Cărbune activ, lipsit de cloruri și fără a le absorbi.

4. Aparatură

Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.

5. Procedura

5.1. Prepararea soluției

În funcție de natura eșantionului, se prepară o soluție conform indicațiilor de la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3.

În același timp, se efectuează un *test martor* fără eșantionul de analizat.

5.1.1. Eșantioane fără materii organice

Se cântăresc maximum 10 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, care conțin maximum 3 g de clor sub formă de cloruri. Se introduc, împreună cu 400 ml de apă, într-un balon gradat de 500 ml la aproximativ 20 °C. Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

5.1.2. Eșantioane care conțin materii organice, exceptând produsele menționate la punctul 5.1.3

Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc, împreună cu 1 g de cărbune activ, într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml apă la aproximativ 20 °C și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.7), se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.8). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

5.1.3. Furaje preparate termic, turte și făină de in, produse bogate în făină de in și alte produse bogate în mucilagii sau în substanțe coloidale (de exemplu amidon dextrinat)

Se prepară soluția astfel cum se descrie la punctul 5.1.2, dar nu se filtrează. Se decantează (dacă este necesar, se centrifughează), se îndepărtează 100 ml lichid supernatant și se transferă într-un flacon de măsurare de 200 ml. Se amestecă cu acetonă (punctul 3.6) și se aduce la volum cu acest solvent, se omogenizează și se filtrează.

5.2. Titrarea

Cu ajutorul unei pipete, se transferă într-un flacon Erlenmeyer o cantitate cuprinsă între de 25 și 100 ml de filtrat (în funcție de conținutul anticipat de clor), obținut astfel cum se descrie la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3. Porția alicotă nu trebuie să conțină mai mult de 150 mg de clor (Cl). Dacă este necesar, se diluează cu maximum 50 ml de apă, se adaugă 5 ml acid azotic (punctul 3.4), 2 ml de soluție saturată de sulfat feric de amoniu (punctul 3.3) și două picături de soluție de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) transferată cu ajutorul unei biurete umplute până la gradația zero. Cu ajutorul unei biurete, se transferă soluția de nitrat de argint (punctul 3.2) astfel încât să se obțină un exces de 5 ml. Se adaugă 5 ml de eter dietilic (punctul 3.5) și se agită puternic pentru a coagula precipitatul. Excesul de nitrat de argint se titrează cu soluția de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) până când colorația maro-roșcat a persistat timp de un minut.

6. Calculul rezultatelor

Cantitatea de clor (X), exprimată ca % de clorură de sodiu, se calculează cu ajutorul următoarei formule:

$$X = \frac{5,845 (V_1 - V_2)}{m} \quad \text{unde:}$$

V_1 = ml de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l adăugată;

V_2 = ml de soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/l utilizată la titrare;

m = g din greutatea eșantionului în partea alicotă.

Dacă testul martor indică un consum de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l, se deduce această valoare din volum ($V_1 - V_2$).

7. *Observații*

7.1. Titarea se poate face și prin potențimetrie sau amperometrie.

7.2. În cazul produselor foarte bogate în uleiuri și grăsimi, se procedează mai întâi la o degresare cu eter dietilic sau cu eter de petrol.

7.3. În cazul făinii de pește, titrarea se poate efectua prin metoda Mohr.

P. DETERMINAREA CARBONAȚILOR

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Metoda permite dozarea carbonaților, în mod convențional exprimați în carbonat de calciu, din furaje cu excepția furajelor în care este prezent carbonatul de fier.

2. *Principiu*

Carbonații se descompun în acid clorhidric; dioxidul de carbon eliberat se colectează într-un tub gradat, iar volumul său se compară cu cel eliberat în aceleași condiții de o cantitate cunoscută de carbonat de calciu.

3. *Reactivi*

3.1. Acid clorhidric, densitate 1,10 g/ml.

3.2. Carbonat de calciu pur.

3.3. Acid sulfuric, aproximativ 0,05 mol/litru, colorat cu roșu de metil.

4. *Aparatură*

Aparatul Scheibler-Dietrich (a se vedea schema din apendice) sau aparatură echivalentă (calcimetru).

5. *Procedură*

În funcție de conținutul de carbonați al eșantionului, se cântărește o porție de eșantion conform indicațiilor de mai jos:

- (a) 0,5 g pentru produsele care conțin 50-100 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;
- (b) 1 g pentru produsele care conțin 40-50 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;
- (c) 2-3 g pentru alte produse.

Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) la porția de eșantion pentru a descompune carbonații prezenți. Volumul de dioxid de carbon se măsoară cu ajutorul aparatului Scheibler-Dietrich sau al unei aparaturi echivalente (calcimetru) și se compară cu volumul de dioxid de carbon produs de 0,5 g de carbonat de calciu pur (punctul 3.2 de mai sus).

Toate determinările se efectuează în aceleași condiții pentru a se evita corectarea diferențelor de temperatură și presiune. Determinarea trebuie efectuată, de preferință, într-o încăpere cu temperatură controlată.

Procedura de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich este descrisă în detaliu în apendice.

6. *Calculul rezultatelor*

Conținutul de carbonați, exprimați drept carbonat de calciu pur, se calculează prin utilizarea următoarei formule:

X =	$V \times 100$
	$V_1 \times 2m$

unde:

X=% (g/g) de carbonați în eșantioane, exprimați drept carbonat de calciu;

V = ml de CO₂ eliberat de porția de eșantion;

V_1 = ml de CO_2 eliberat de 0,5 g de CaCO_3 ;

m = greutatea, în grame, a porției de eșantion.

7. *Observații*

7.1. În cazul în care se utilizează aparatul Scheibler-Dietrich, iar eșantionul cântărește mai mult de 2 g, se introduc mai întâi 15 ml de apă distilată în flacon (punctul 4 din schema din apendicele de mai jos) și se amestecă înainte de începerea testului prin adăugarea de acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus). În testul de control se utilizează același volum de apă distilată.

7.2. Dacă aparatul utilizat are un volum diferit de cel al aparatului Scheibler-Dietrich, porțiile prelevate din eșantion și din substanța de control, precum și calculul, trebuie adaptate corespunzător.

Apendice

Procedura detaliată de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich

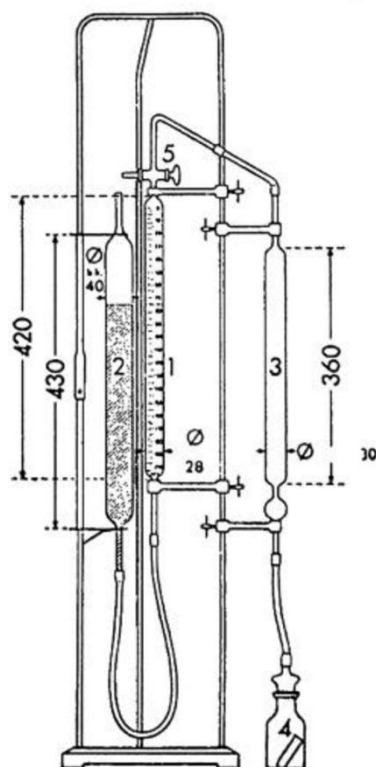
Porția de eșantion se introduce în flaconul special (punctul 4 din schemă) al aparatului, dotat cu un mic tub din material indestructibil care conține 10 ml acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus), apoi se conectează flaconul la aparat. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) astfel încât tubul gradat (punctul 1 din schemă) să se conecteze cu exteriorul. Cu ajutorul unui tub mobil (punctul 2 din schemă), care este umplut cu acid sulfuric colorat (punctul 3.3 de mai sus) și este conectat la tubul gradat (punctul 1 din schemă) se aduce nivelul lichidului la gradația zero. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) în așa fel încât să se asigure comunicația între tuburi (punctele 1 și 3 din schemă) și se verifică nivelul zero.

Se lasă să se prelingă lent acidul clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) pe porția de eșantion înclinând flaconul special (punctul 4 din schemă). Se egalizează presiunea lăsând în jos tubul mobil (punctul 2 din schemă). Se agită flaconul special (punctul 4 din schemă) până la oprirea completă a degajării dioxidului de carbon.

Se restabilește presiunea, readucând lichidele la același nivel în tuburi (punctele 1 și 2 din schemă). După câteva minute, când volumul de gaz a devenit constant, se face citirea.

Se efectuează un test de control, în aceleași condiții, cu 0,5 g de carbonat de calciu (punctul 3.2 de mai sus).

APARATUL SCHEIBLER-DIETRICH PENTRU DETERMINAREA CO₂



(Dimensiuni în mm)

Anexă nr.4
la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLAREA NIVELULUI AUTORIZAT DE ADITIVI DIN FURAJE

A. DETERMINAREA VITAMINEI A

Vitamina A se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17547:2022 Hrană pentru animale:
Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea conținutului de vitamine A, E și
D

– Metodă care utilizează extracția în fază solidă (SPE) și cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescență, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos.

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină A (retinol) din furaje. Vitamina A include alcoolul all-*trans*-retinil și izomerii săi *cis*, care se determină prin această metodă. Conținutul de vitamină A se exprimă în unități internaționale (UI) per kg O UI corespunde activității a 0,300 μg de alcool all-*trans*-vitamină A sau a 0,344 μg all-*trans*-vitamină A acetat sau 0,550 μg all-*trans*-vitamină A palmitat.

Limita de cuantificare este 2 000 UI de vitamină A/kg.

2. **Principiu**

Eșantionul se hidrolizează cu o soluție de hidroxid de potasiu etanolic, iar vitamina A se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol și, dacă este necesar, se diluează până la concentrația necesară. Conținutul de vitamină A se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector de UV sau de fluorescență. Parametrii cromatografiei se aleg astfel încât să nu existe separație între alcoolul all-*trans*-vitamina A și izomerii săi *cis*.

3. **Reactivi**

3.1. Etanol, σ = 96 %

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

3.3. Metanol

3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, c = 50 g/100 ml

3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, c = 10 g/100 ml (a se vedea observațiile de la punctul 7.7)

3.6. Sulfură de sodiu, Na₂S · x H₂O (x = 7 - 9)

3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu, c = 0,5 mol/l în glicerol, β = 120 g/l (pentru x = 9) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8)

3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1)

3.8. 2-propanol

3.9. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite.

3.10. Azot, lipsit de oxigen

3.11. All-*trans*-vitamină A acetat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu, $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$

3.11.1. Soluție stoc de all-*trans*-vitamină A acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de vitamină A acetat (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.1.

3.12. All-*trans*-vitamină A palmitat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$

3.12.1. Soluție stoc de all-*trans*-vitamină A palmitat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 80 mg de vitamină A palmitat (punctul 3.12) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*terț*-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5)

4. Aparatură

4.1. Evaporator rotativ cu vid

4.2. Sticlărie laborator brună

4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.

4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml.

4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită.

4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.

4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz

4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție

4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, cu particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent (criteriu de performanță: un singur vârf pentru toți izomerii de retinol în condițiile HPLC).

4.5.2. Detector de UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă.

4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm.

4.7. Baie de apă cu agitator magnetic.

4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din:

4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite.

4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

5. *Procedura*

Notă: Vitamina A este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

5.1. *Pregătirea eșantionului*

Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina A. Nu se macină eșantionul (eșantioanele) în cazul în care distribuția granulometrică este adecvată (de exemplu, preamestecuri și aditivi furajeri).

5.2. *Saponificarea*

În funcție de conținutul de vitamină A, se cântăresc 2-25 g de eșantion cu o abatere de 1 mg într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1). În cazul concentrațiilor scăzute, greutatea eșantionului poate fi mărită pentru a avea suficiente particule în porțiunea de testare. Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.13), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la balon și acesta se scufundă într-o baie de apă cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei.

5.3. Extracție

Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție (punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute.

5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2).

Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolfaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. **Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8)**

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat.

5.4. ***Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC***

Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.10) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un jet de azot (punctul 3.10), iar reziduul se dizolvă imediat într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de vitamină A trebuie să fie cuprinsă în intervalul 5-30 UI/ml).

5.5. ***Determinarea prin HPLC***

Vitamina A se separă pe o coloană cu fază inversată C18 (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de UV (punctul 325 nm) sau un detector de fluorescență (excitație: 325 nm, emisie: 475 nm) (punctul 4.5.2).

Se injectează o porție alicotă (de exemplu 20 µl) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.9). Se calculează înălțimea medie a vârfului (aria) mai multor injectări ale aceleiași soluții de eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor mai multor injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2).

Condiții HPLC

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.9):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/min
Detector (punctul 4.5.2):	detector de UV (punctul 325 nm) sau detector de fluorescență (excitație: 325 nm/emisie: 475 nm)

5.6. Calibrarea

5.6.1. Prepararea soluțiilor etalon de lucru

Se pipetează 20 ml de soluție stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) sau 20 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează astfel cum se descrie la punctul 5.2, dar fără a se adăuga BHT. În continuare se extrage cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.2). Se lasă să se evaporeze 100 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.10) și se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 560 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.3. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

Se pipetează 2,0 ml din această soluție etalon de lucru într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrația nominală a acestei soluții etalon de lucru diluate este de 56 UI de vitamină A per ml.

5.6.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 5,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru diluată într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul

3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt de 2,8, 5,6, 14,0 și respectiv 28,0 UI de vitamină A per ml.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μ l din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. Utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare ținând cont de rezultatele obținute cu soluția de control UV (punctul 5.6.3.3).

5.6.3. Standardizarea UV a soluțiilor etalon

5.6.3.1. Soluția stoc de vitamină A acetat

Se pipetează 2,0 ml din soluția stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A acetat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{326} 19,0$$

$$\left(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A acetat} = 1\,530 \text{ la } 326 \text{ nm în 2-Propanol} \right)$$

5.6.3.2. Soluția stoc de vitamină A palmitat

Se pipetează 2,0 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la gradatie cu propanol-2 (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A palmitat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{326} 19,0$$

$$\left(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A palmitat} = 957 \text{ la } 326 \text{ nm în 2-Propanol} \right)$$

5.6.3.3. Soluția etalon de lucru de vitamină A

Se pipetează 3,0 ml din soluția etalon de lucru nediluată de vitamină A, preparată conform punctului 5.6.1, într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Se pipetează 5,0 ml din această soluție într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$\text{UI vitamină A/ml} = E_{325} 18,30$$

$$\left(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ pentru vitamină A alcool} = 1\,821 \text{ la } 325 \text{ nm în 2-Propanol} \right)$$

6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de vitamină A ale soluției de eșantion se determină concentrația soluției de eșantion în UI/ml prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.2).

Conținutul w de vitamină A al eșantionului, în UI/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \ c \ V_2 \ 1\,000}{V_1 \ m} \text{ [IU/kg]} \quad \text{unde:}$$

c = concentrația de vitamină A a soluției de eșantion (punctul 5.4), în UI/ml;

V_1 = volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml;

V_2 = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml;

m = greutatea porțiunii de testat, în g.

7. Observații

7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină A poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC.

7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsime.

7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia.

7.4. În cazul uleiului din ficat de cod și al altor grăsimi pure, timpul de saponificare se prelungește la 45-60 minute.

7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă.

7.6. Utilizându-se o coloană cu fază normală, separarea izomerilor de retinol este posibilă. Dar în acest caz, înălțimile (ariile) vârfurilor izomerilor all-cis și all-trans trebuie însumate pentru a face calcule.

7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic.

7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA.

7.9. În cazul analizării vitaminei A în înlocuitorii de lapte, se acordă o atenție deosebită la

— saponificare (punctul 5.2): din cauza cantității de grăsimi prezente în eșantion, poate fi necesară creșterea cantității de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4);

— extracție (punctul 5.3): din cauza prezenței emulsiilor, poate fi necesară adaptarea valorii raportului de 2:1 pentru apă/etanol.

Pentru a verifica dacă metoda de analizare aplicată generează rezultate fiabile pentru această matrice specifică (înlocuitor de lapte), se aplică un test de recuperare pe o porție suplimentară de testat. Dacă rata de recuperare este mai mică de 80 %, rezultatul analitic trebuie corectat în funcție de recuperare.

8. *Repetabilitate*

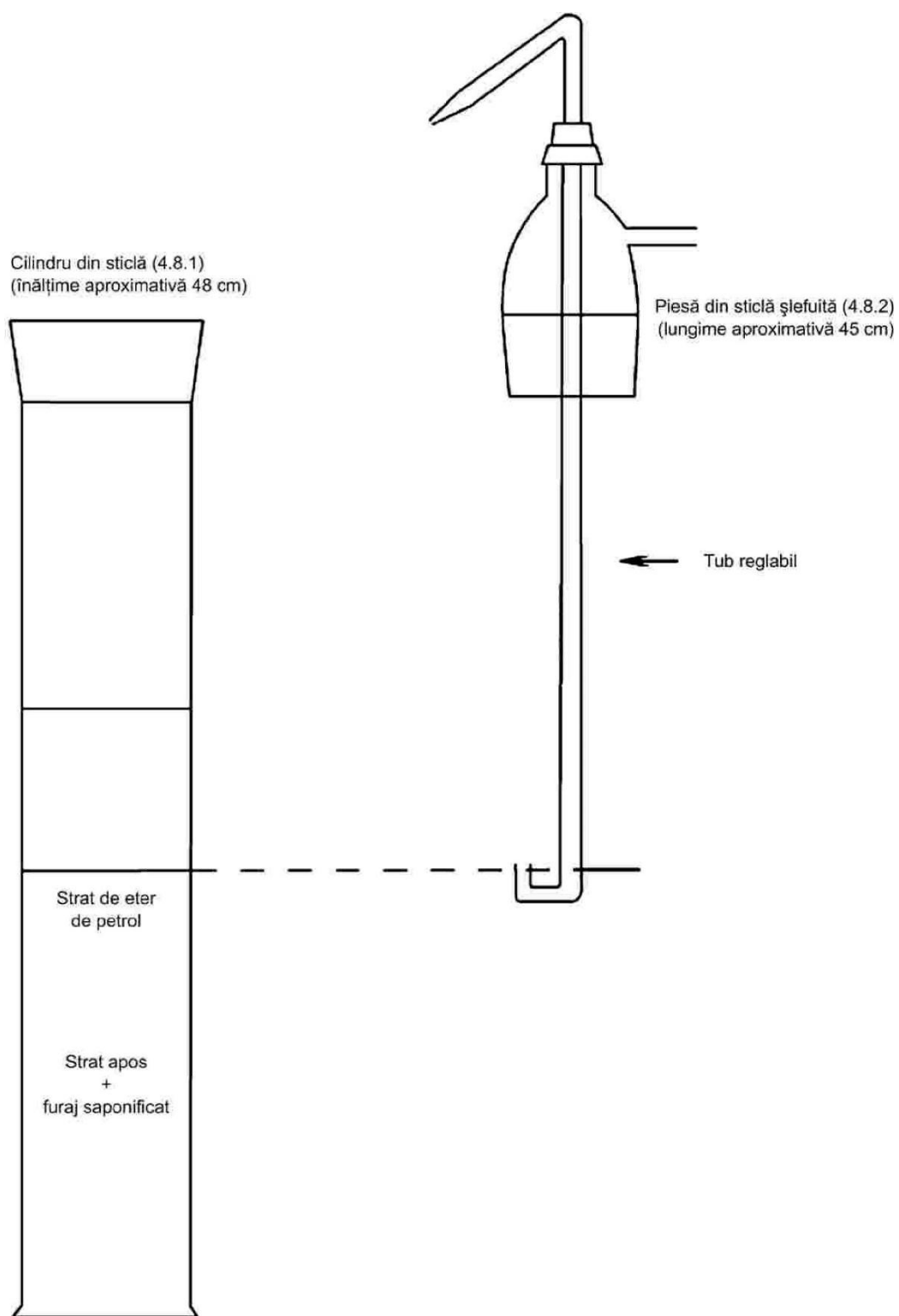
Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.

9. *Rezultatele unui studiu colaborativ*

	Preamestec	Furaje de tip preamestec	Concentrate minerale	Furaje proteice	Hrană pentru purcei
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
medie (UI/kg)	$17,02 \times 106$	$1,21 \times 106$	537 100	151 800	18 070
sr (UI/kg)	$0,51 \times 106$	$0,039 \times 106$	22 080	12 280	682
r (UI/kg)	$1,43 \times 106$	$0,109 \times 106$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR (UI/kg)	$1,36 \times 106$	$0,069 \times 106$	46 300	23 060	3 614
R (UI/kg)	$3,81 \times 106$	$0,193 \times 106$	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L: număr de laboratoare n: număr de valori unice sr: deviația standard a repetabilității sR: deviația standard a reproductibilității r: repetabilitate R: reproductibilitate CVr: coeficientul de variație a repetabilității CVR: coeficientul de variație a reproductibilității					

Figura 1

Aparat de extracție (punctul 4.8)



B. DETERMINAREA VITAMINEI E

Vitamina E se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17547:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea conţinutului de vitamine A, E şi D – Metodă care utilizează extracţia în fază solidă (SPE) şi cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescenţă, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos.

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină E din furaje. Conţinutul de vitamină E se exprimă ca mg DL- α -tocoferol acetat per kg 1 mg DL- α -tocoferol acetat corespunde la 0,91 mg DL- α -tocoferol (vitamină E).

Limita de cuantificare este 2 mg de vitamină E/kg Această limită de cuantificare se obţine doar cu detectorul de fluorescenţă. Cu un detector de UV, limita de cuantificare este 10 mg/kg

2. Principiu

Eşantionul se hidrolizează cu o soluţie etanolică de hidroxid de potasiu, iar vitamina E se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol şi, dacă este necesar, se diluează până la concentraţia necesară. Conţinutul de vitamina E se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de fluorescenţă sau de UV.

3. Reactivi

3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$

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

3.3. Metanol

3.4. Soluţie de hidroxid de potasiu, $c = 50 \text{ g/100 ml}$

3.5. Soluţie de ascorbat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (a se vedea observaţiile de la punctul 7.7)

3.6. Sulfură de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)

3.6.1. Soluţie de sulfură de sodiu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ în glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pentru $x = 9$) (a se vedea observaţiile de la punctul 7.8)

3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1)

3.8. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite.

3.9. Azot, lipsit de oxigen

3.10. DL- α -tocoferol acetat, extra pur, cu activitate certificată

3.10.1. Soluție stoc de DL- α -tocoferol acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL- α -tocoferol acetat. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.1.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4).

3.11. DL- α -tocoferol, extra pur, cu activitate certificată

3.11.1. Soluție stoc de DL- α -tocoferol: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL- α -tocoferol (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL- α -tocoferol. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.2.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4).

3.12. 2,6-di-*terț*-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5)

4. *Aparatură*

4.1. Evaporator rotativ cu generare de film.

4.2. Sticlărie laborator brună

4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită;

4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml;

4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită;

4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.

4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz.

4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție

4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent;

4.5.2. Detector de fluorescență sau de UV, cu ajustare variabilă a lungimii de undă.

4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm.

4.7. Baie de apă cu agitator magnetic.

4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din:

4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite;

4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

5. *Procedura*

Notă: Vitamina E este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

5.1. *Pregătirea eșantionului*

Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina E.

5.2. *Saponificarea*

În funcție de greutatea conținutului de vitamina E, se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, 2-25 g de eșantion într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1). Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.12), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la vas și se introduce vasul într-o baie de apă

cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei.

5.3. Extracție

Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție (punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energetic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute.

5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2).

Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter

de petrol (punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat.

5.4. *Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC*

Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.9) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă imediat reziduul într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de DL- α -tocoferol trebuie să fie în intervalul 5-30 μ g/ml).

5.5. *Determinarea prin HPLC*

Vitamina E se separă pe o coloană cu fază inversată C₁₈ (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de fluorescență (excitație: 295 nm, emisie: 330 nm) sau un detector UV (292 nm) (punctul 4.5.2).

Se injectează o porție alicotă (de exemplu, 20 μ l) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.8). Se calculează înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale aceleiași soluții eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2).

Condiții HPLC

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.8):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu, 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/min
Detector (punctul 4.5.2)	Detector de fluorescență (excitație: 295 nm/emisie: 330 nm) sau detector UV (292 nm)

5.6. Calibrare (*DL-α-tocoferol acetat sau DL-α-tocoferol*)

5.6.1. Etalon de DL-α-tocoferol acetat

5.6.1.1. Prepararea soluției etalon de lucru

Se picură din pipetă 25 ml din soluția stoc de DL-α-tocoferol acetat (punctul 3.10.1) într-un balon cu fundul plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează conform procedurii descrise la punctul 5.2. Se realizează apoi extracția cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol. Se lasă să se evaporeze 25 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă din nou reziduul în 25,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 45,5 μg DL-α-tocoferol per ml, echivalent cu 50 μg DL-α-tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.1.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,5, 5,0, 10,0 și 25,0 μg/ml DL-α-tocoferol acetat, echivalent cu 2,28, 4,55, 9,10 μg/ml și 22,8 μg/ml DL-α-tocoferol.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.1.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1)

Se diluează 5,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6), între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă este de 284 nm:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6$ la 284 nm în etanol La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție între 0,84 și 0,88.

5.6.2. Etalonul de DL- α -tocoferol

5.6.2.1. Prepararea soluției etalon de lucru

Se pun cu pipeta 2 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml, se dizolvă în metanol (punctul 3.3) și se completează până la semn cu metanol. Concentrația nominală a acestei soluții este de 40 μg DL- α -tocoferol per ml, echivalent cu 44,0 μg DL- α -tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.2.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,0, 4,0, 8,0 și 20,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tocoferol, echivalent cu 2,20, 4,40, 8,79 $\mu\text{g/ml}$ și 22,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tocoferol acetat.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.2.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1)

Se diluează 2,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6) între 250 nm și 320 nm. Absorbția maximă este de 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ la } 292 \text{ nm în etanol}$$

La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție de 0,6.

6. *Calculul rezultatelor*

Pornindu-se de la înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de vitamina E ale soluției de eșantion, se determină concentrația soluției de eșantion în $\mu\text{g/ml}$ (calculată ca DL- α -tocoferol acetat) prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.1.2 sau 5.6.2.2).

Conținutul w de vitamina E al eșantionului, exprimat în mg/kg , este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \text{ c } V_2}{V_1 \text{ m}} [\text{mg/kg}]$$

unde:

c = concentrația de vitamina E (ca DL- α -tocoferol acetat) al soluției de eșantion (punctul 5.4) în $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml

V_2 = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. *Observații*

7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină E poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC.

7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsime.

7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia.

7.4. Odată efectuată măsurătoarea spectrofotometrică a soluției de DL- α -tocoferol acetat sau de DL- α -tocoferol, conform punctului 5.6.1.3 sau 5.6.2.3, se adaugă cca 10 mg de BHT (punctul 3.12) la soluție (punctul 3.10.1 sau 3.10.2) și se conservă soluția la frigider (durata maximă de stocare patru săptămâni).

7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă.

7.6. Utilizându-se o coloană în fază normală este posibilă separarea tocoferolilor α , β , γ și δ .

7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic.

7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA.

7.9. Acetatul de vitamina E hidrolizează foarte rapid în condiții alcaline fiind, prin urmare, foarte sensibil la oxidare, mai ales în prezența oligoelementelor, cum ar fi fierul sau cuprul. Determinarea vitaminei E în preamestecuri la niveluri de peste 5 000 mg/kg ar avea drept consecință o degradare a vitaminei E. Prin urmare, pentru confirmare se recomandă o metodă HPLC care include o digestie enzimatică a preparatului de vitamina E fără o etapă de saponificare alcalină

8. *Repetabilitate.*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.

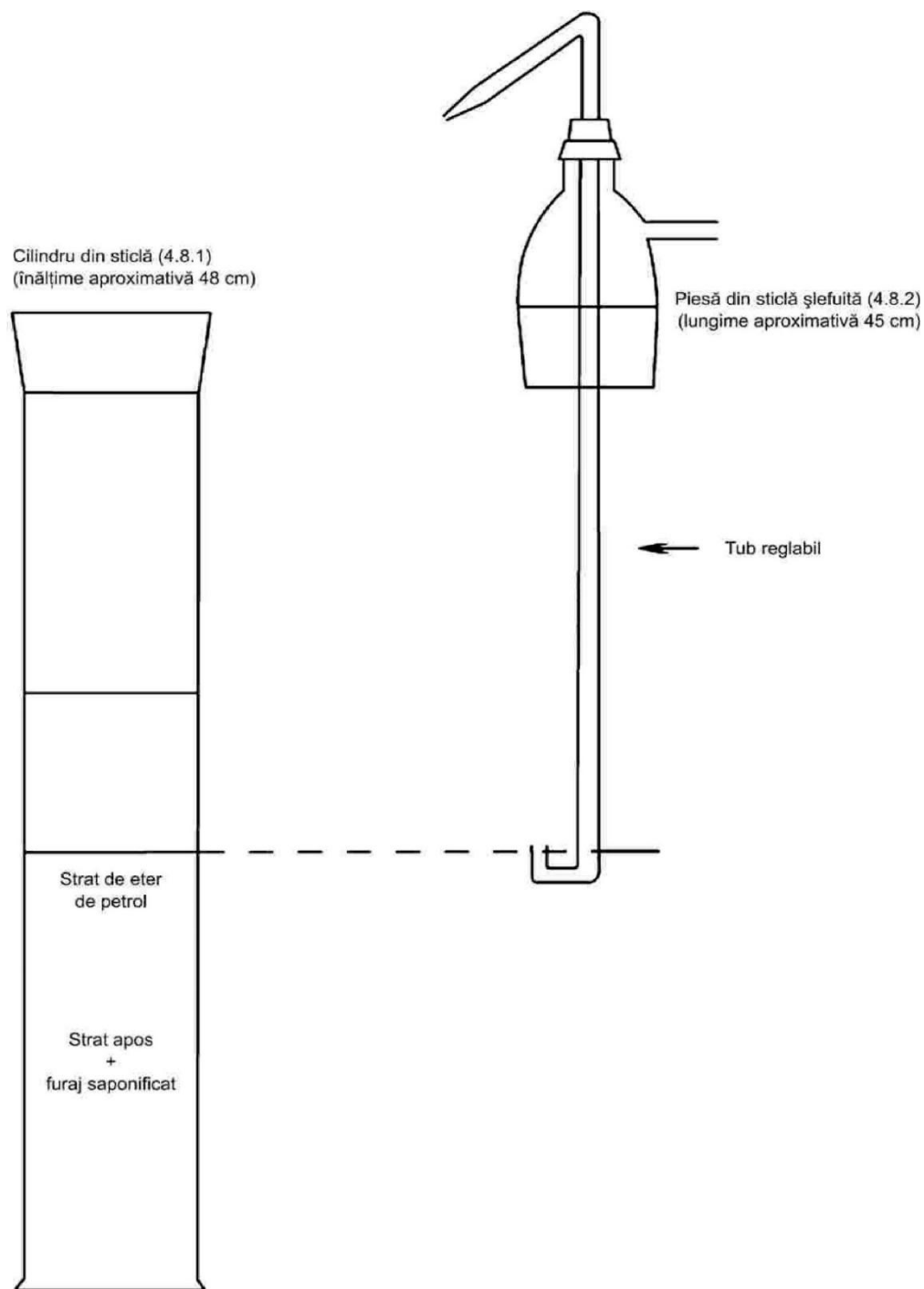
9. *Rezultatele unui studiu colaborativ ([22](#))*

	Preamestec	Furaje de tip preamestec	Concentrate minerale	Furaje proteice	Hrană pentru purcei
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
medie (mg/kg)	17 380	1 187	926	315	61,3
sr (mg/kg)	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r (mg/kg)	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR (mg/kg)	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R (mg/kg)	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8

CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7
L: număr de laboratoare n: număr de valori unice s _r : deviația standard a repetabilității s _R : deviația standard a reproductibilității r: repetabilitate R: reproductibilitate CV _r : coeficientul de variație a repetabilității CV _R : coeficientul de variație a reproductibilității					

Figura 2

Aparat de extracție (punctul 4.8)



C. DETERMINAREA OLIGOELEMENTELOR FIER, CUPRU, MANGAN ȘI ZINC

Conținutul de fier, cupru, mangan și zinc se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale:
Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului,

magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES; sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 15621:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17053:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă); sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM SR EN ISO 6869:2012 Hrană pentru animale: Determinarea conținutului de calciu, cupru, fier, magneziu, mangan, potasiu, sodiu și zinc. Metoda care utilizează spectrometria de absorbție atomică; sau

— Metoda spectrometriei de absorbție atomică cu flacără (FAAS), descrisă la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea oligoelementelor fier, cupru, mangan și zinc din furaje ([23](#)). Limitele de cuantificare sunt:

— fier (Fe): 20 mg/kg

— cupru (Cu): 10 mg/kg

— mangan (Mn): 20 mg/kg

— zinc (Zn): 20 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul este pus în soluție de acid clorhidric după distrugerea materiei organice, dacă aceasta este prezentă. Se determină elementele fier, cupru, mangan și zinc, după o diluare corespunzătoare, cu ajutorul spectrometriei de absorbție atomică.

3. Reactivi

Comentarii introductive

Pentru prepararea reactivilor și a soluțiilor analitice se folosește apă fără cationii care urmează să fie determinați, obținută fie prin distilarea dublă a apei într-

un distilator din sticlă borosilicat sau din cuarț, fie prin dublu tratament cu rășină schimbătoare de ioni.

Reactivii trebuie să fie cel puțin de calitate analitică. Absența elementului care urmează să fie determinat trebuie verificată într-un experiment martor. Dacă este necesar, reactivii trebuie să fie purificați în continuare.

În locul soluțiilor etalon descrise mai jos pot fi folosite soluții etalon din comerț, cu condiția ca ele să fie garantate și să fi fost verificate înainte de utilizare.

3.1. Acid clorhidric. (d:1,19 g/ml).

3.2. Acid clorhidric. (6 mol/litru).

3.3. Acid clorhidric. (0,5 mol/litru).

3.4. Acid fluorhidric 38-40 % (v/v) cu un conținut de fier (Fe) de mai puțin de 1 mg/litru și un reziduu după evaporare de mai puțin de 10 mg (ca sulfat)/litru.

3.5. Acid sulfuric. (d: 1,84 g/ml).

3.6. Peroxid de hidrogen. [circa 100 volume de oxigen (punctul 30 % în greutate)].

3.7. Soluție etalon de fier (1 000 $\mu\text{g Fe/ml}$) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: se dizolvă 1 g de sârmă de fier în 200 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 16 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă.

3.7.1. Soluție etalon de lucru de fier (100 $\mu\text{g Fe/ml}$) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.7) cu 9 părți de apă.

3.8. Soluție etalon de cupru (1 000 $\mu\text{g Cu/ml}$) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:

— se dizolvă 1 g de praf de cupru în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă.

3.8.1. Soluție etalon de cupru de lucru (10 $\mu\text{g Cu/ml}$) preparată diluând o parte din soluția standard (punctul 3.8) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.

3.9. Soluție etalon de mangan (1 000 $\mu\text{g Mn/ml}$) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:

— se dizolvă 1 g de praf de mangan în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă.

3.9.1. Soluție etalon de lucru de mangan (10 $\mu\text{g Mn/ml}$) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.9) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.

3.10. Soluție etalon de zinc (1 000 $\mu\text{g Zn/ml}$) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:

— se dizolvă 1 g de zinc sub formă de benzi sau folii în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă.

3.10.1. Soluție etalon de lucru de zinc (10 $\mu\text{g Zn/ml}$) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.10) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă.

3.11. Soluție de clorură de lantan: se dizolvă 12 g de oxid de lantan în 150 ml de apă, se adaugă 100 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă.

4. Aparatură

4.1. Cuptor cu muflă cu reglare de temperatură și, preferabil, cu dispozitiv de înregistrare.

4.2. Sticlăria trebuie să fie de tip borosilicat rezistent și se recomandă folosirea aparaturii rezervate exclusiv pentru determinarea oligoelementelor.

4.3. Spectrofotometru de absorbție atomică care îndeplinește cerințele metodei cu privire la sensibilitatea și precizia în intervalul necesar.

5. Procedura ([24](#))

5.1. Eșantioane care conțin materie organică

5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză ([25](#))

5.1.1.1. Se introduc 5-10 g de eșantion cântărit cu o abatere de 0,2 mg într-un creuzet de cuarț sau platină [a se vedea nota (b)], se usucă într-un cuptor la 105 °C și se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă neîncălzit (punctul 4.1). Se închide cuptorul [a se vedea nota (c)] și se mărește treptat temperatura până la 450-475 °C, timp de circa 90 de minute. Se menține temperatura timp de 4-16 ore (de exemplu, peste

noapte) pentru a îndepărta materialul carbonic și apoi se deschide cuptorul și se lasă să se răcească [a se vedea nota (d)].

Se umezește cenușa cu apă și se transferă substanța obținută într-un pahar de laborator de 250 ml. Se spală creuzetul cu o cantitate totală de circa 5 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) și se adaugă acesta din urmă încet și cu atenție în paharul de laborator (poate apărea o reacție puternică din cauza formării de CO_2). Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1), picătură cu picătură, agitându-se, până când efervescența încetează. Se evaporă până la uscare, agitându-se din când în când cu o baghetă de sticlă.

Se adaugă apoi 15 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) la reziduu, apoi circa 120 ml de apă. Se amestecă cu bagheta de sticlă, care se lasă în paharul de laborator, și se acoperă paharul cu o sticlă de ceas. Se aduce încet la fierbere și se menține la punctul de fierbere până când cenușa se dizolvă complet. Se filtrează cu hârtie de filtru lipsită de cenușă și se colectează filtratul într-un balon gradat de 250 ml. Se spală paharul de laborator și se filtrează cu 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru fierbinte (punctul 3.2) și de două ori cu apă fiartă. Se umple balonul gradat cu apă până la semn (concentrația de HCl: circa 0,5 mol/litru).

5.1.1.2. Dacă reziduul din filtru este negru (cărbune), se reintroduce în cuptor și se calcinează din nou la 450-475 °C. Calcinarea, care necesită numai câteva ore (între trei și cinci ore), este completă când cenușa este albă sau aproape albă. Se dizolvă reziduul cu aproximativ 2 ml de acid clorhidric (punctul 3.1), se evaporă până la uscare și se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2). Se încălzește, se filtrează soluția în balonul gradat și se umple cu apă până la semn (concentrația HCl: circa 0,5 mol/litru).

Note:

(a) Este important ca atunci când se măsoară oligoelementele să se țină cont de riscul de contaminare, în special cu zinc, cupru și fier. Din acest motiv, echipamentul folosit în cursul preparării eșantioanelor trebuie să nu conțină aceste metale.

Pentru reducerea riscului general de contaminare, se lucrează într-o atmosferă fără praf, folosind un echipament curățat cu mare atenție și o sticlărie spălată cu grijă. Determinarea zincului este în mod special sensibilă la multe tipuri de contaminare, de exemplu prin intermediul sticlăriei, al reactivilor, al prafului etc.

(b) Greutatea eșantionului care urmează să fie calcinat rezultă din cantitatea aproximativă de oligoelemente din furaje în raport cu sensibilitatea

spectrofotometrului folosit. Pentru anumite tipuri de furaje, sărace în oligoelemente, poate fi necesar să se înceapă cu un eșantion de 10-20 g și să se completeze soluția finală numai până la 100 ml.

(c) Arderea trebuie efectuată într-un cuptor închis fără injectare de aer sau de oxigen.

(d) Temperatura indicată de piometru nu trebuie să depășească 475 °C.

5.1.2. Determinarea spectrofotometrică

5.1.2.1. Pregătirea soluțiilor de calibrare

Pentru fiecare dintre elementele care urmează să fie determinate se prepară din soluțiile etalon de lucru de la punctele 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 și 3.10.1 o gamă de soluții de calibrare, fiecare soluție de calibrare având o concentrație de HCl de aproximativ 0,5 mol/litru și (în cazul fierului, manganului și zincului) o concentrație de clorură de lantan echivalentă cu 0,1 % La (g/v).

Concentrațiile de oligoelemente selectate trebuie să se situeze în intervalul sensibilității spectrofotometrului utilizat. Tabelele prezentate în continuare indică, de exemplu, compozițiile unor seturi tipice de soluții de calibrare; totuși, în funcție de tipul și sensibilitatea spectrofotometrului folosit, poate fi necesar să se selecteze alte concentrații.

Fier

μg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.7.1) (1 ml = 100 μg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

Cupru

μg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.8.1) (1 ml = 10 μg Cu)	0	1	2	4	6	8	10

ml HCl (punctul 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.9.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Mn}$)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

Zinc

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.10.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Zn}$)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

5.1.2.2. Prepararea soluției pentru analiză

Pentru determinarea cuprului, soluția preparată la punctul 5.1.1 poate fi, în mod normal, folosită direct. Dacă este necesar să se obțină o concentrație situată în intervalul soluțiilor de calibrare, o parte alicotă poate fi pipetată într-un balon gradat de 100 ml și completată până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3).

Pentru determinarea fierului, manganului și zincului, se pipetează o parte alicotă din soluția preparată la punctul 5.1.1 într-un balon gradat de 100 ml, se adaugă 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3) (a se vedea și punctul 8, „Observații”).

5.1.2.3. Experiment martor

Experimentul martor trebuie să includă toate etapele prevăzute în procedură, cu excepția faptului că materialul de eșantion este omis. Soluția de calibrare „0” nu trebuie să fie folosită ca martor.

5.1.2.4. Măsurarea absorbției atomice

Se măsoară absorbția atomică a soluțiilor de calibrare și a soluției care urmează să fie analizată folosind o flacără aer-acetilenă oxidantă, la următoarele lungimi de undă:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Fiecare măsurătoare se realizează de patru ori.

5.2. Furaje minerale

Dacă eșantionul nu conține materie organică, calcinarea prealabilă nu este necesară. Se procedează conform descrierii de la punctul 5.1.1.1, începând de la al doilea paragraf. Evaporarea cu acid fluorhidric poate fi omisă.

6. Calculul rezultatelor

Folosind o curbă de calibrare, se calculează concentrația de oligoelemente în soluția care urmează să fie analizată și se exprimă rezultatul în mg de oligoelemente per kg de eșantion (ppm).

7. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același laborant nu depășește:

— 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de oligoelement în cauză până la 50 mg/kg;

— 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 50 până la 100 mg/kg;

— 10 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 100 până la 200 mg/kg;

— 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză mai mare de 200 mg/kg.

8. *Observație*

Prezența de cantități mari de fosfați ar putea interfera cu determinarea fierului, manganului și zincului. Astfel de interferențe trebuie să fie corectate adăugând soluție de clorură de lantan (punctul 3.11). Dacă, însă, în eșantion, raportul de greutate Ca + Mg/P este > 2, adăugarea soluției de clorură de lantan (punctul 3.11) la soluția de analizat și la soluțiile de calibrare poate fi omisă.

D. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HALOFUGINONĂ

DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid

Conținutul de halofuginonă se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de halofuginonă din furaje. Limita de cuantificare este de 1 mg/kg

2. Principiu

După tratarea cu apă fierbinte, halofuginona se extrage ca bază liberă în acetat de etil și ulterior se separă ca clorhidrat, într-o soluție apoasă de acid. Extractul se purifică prin cromatografie prin schimb ionic. Conținutul de halofuginonă se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), prin utilizarea unui detector de raze UV.

3. Reactivi

3.1. Acetonitril, de calitate HPLC

3.2. Rășină Amberlit XAD-2

3.3. Acetat de amoniu

3.4. Acetat de etil

3.5. Acid acetic glacial

3.6. Substanța etalon halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid, E 764)

3.6.1. Soluție etalon stoc de halofuginonă, 100 µg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de halofuginonă (punctul 3.6) într-un balon gradat de 500 ml, apoi se dizolvă în soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18), se completează până la semn cu soluție tampon și se amestecă. Această soluție este stabilă timp de trei săptămâni, la 5 °C, dacă este depozitată la întuneric.

3.6.2. Soluții de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.6.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.21) și se amestecă. Soluțiile au concentrații de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 µg/ml de halofuginonă. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

3.7. Acid clorhidric (ρ_{20} aproximativ 1,16 g/ml).

3.8. Metanol

3.9. Nitrat de argint

3.10. Ascorbat de sodiu

3.11. Carbonat de sodiu

3.12. Clorură de sodiu

3.13. EDTA (acid etilendiaminotetraacetic, sare disodică)

3.14. Apă, de calitate HPLC

3.15. Soluție de carbonat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$

3.16. Soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu, $c = 5 \text{ g/100 ml}$

Se dizolvă 50 g de carbonat de sodiu (punctul 3.11) în apă, se diluează până la 1 litru și se adaugă clorură de sodiu (punctul 3.12) până la saturarea soluției.

3.17. Acid clorhidric, aproximativ $0,1 \text{ mol/l}$

Se diluează 10 ml de HCl (punctul 3.7) în apă până la 1 litru.

3.18. Soluție tampon de acetat de amoniu, aproximativ $0,25 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 19,3 g de acetat de amoniu (punctul 3.3) și 30 ml de acid acetic (punctul 3.5) în apă (punctul 3.14) și se diluează până la 1 litru.

3.19. Prepararea rășinii de Amberlit XAD-2

Se spală cu apă o cantitate corespunzătoare de Amberlit (punctul 3.2), până la îndepărtarea tuturor ionilor de clor, după cum indică testul cu nitrat de argint (punctul 3.20) efectuat pe faza apoasă eliminată. Apoi se spală rășina cu 50 ml de metanol (punctul 3.8), se elimină metanolul și se depozitează rășina în metanol proaspăt.

3.20. Soluție de nitrat de argint, aproximativ $0,1 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 0,17 g de nitrat de argint (punctul 3.9) în 10 ml de apă.

3.21. Fază mobilă HPLC

Se amestecă 500 ml de acetonitril (punctul 3.1) cu 300 ml soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18) și 1 200 ml de apă (punctul 3.14). Se aduce pH-ul la valoarea 4,3 folosind acid acetic (punctul 3.5). Se trece printr-un filtru de $0,22 \mu\text{m}$ (punctul 4.8) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute). Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este depozitată într-un recipient închis, la întuneric.

4. Aparatură

4.1. Baie cu ultrasunete

4.2. Evaporator rotativ cu generare de film

4.3. Centrifugă

4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu grup de diode

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 300 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 10 μm sau o coloană echivalentă

4.5. Coloană de sticlă (300 mm × 10 mm) prevăzută cu filtru de sticlă sinterizată și cu robinet de închidere

4.6. Filtre din fibră de sticlă, cu diametru de 150 mm

4.7. Filtre cu membrană, 0,45 μm

4.8. Filtre cu membrană, 0,22 μm

5. Procedura

Notă Halofuginona ca bază liberă este instabilă în soluții alcaline sau de acetat de etil. Ea nu trebuie să rămână în acetat de etil mai mult de 30 de minute.

5.1. Generalități

5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența halofuginonei și a substanțelor interferente.

5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de halofuginonă, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 3 mg/kg se adaugă 300 μl din soluția etalon stoc (punctul 3.6.1) la 10 g de furaj martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2).

Notă: Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează halofuginonă.

5.2. Extracție

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 g, 10 g de eșantion preparat, într-un tub de centrifugă de 200 ml, se adaugă 0,5 g de ascorbat de sodiu (punctul 3.10), 0,5 g de EDTA (punctul 3.13) și 20 ml de apă, apoi se amestecă. Se plasează tubul într-o baie de apă timp de 5 minute (80 °C). După răcire la temperatura camerei se adaugă 20 ml soluție de carbonat de sodiu (punctul 3.15) și se amestecă. Se adaugă imediat 100 ml de acetat de etil (punctul 3.4) și se agită energic cu mâna timp de 15 secunde. Apoi tubul se așază într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) timp de 3 minute și se slăbește dopul. Se centrifughează timp de 2 minute și se decantează faza de acetat de etil printr-un filtru de fibră de sticlă (punctul 4.6), într-o pâlnie de separare de 500 ml. Se repetă extracția eșantionului cu o a doua cantitate de 100 ml acetat de etil. Se

spală extractele combinate timp de un minut cu 50 ml de soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu (punctul 3.16) și se îndepărtează stratul apos.

Se extrage stratul organic timp de 1 minut cu 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.17). Se trece stratul inferior de acid printr-o pâlnie de separare de 250 ml. Se extrage din nou stratul organic timp de 1,5 minute, cu o altă cantitate de 50 ml acid clorhidric, apoi se combină cu primul extract. Se spală extractele de acid combinate prin agitare circulară timp de aproximativ 10 secunde cu 10 ml de acetat de etil (punctul 3.4).

Se transferă cantitativ stratul apos într-un balon cu fund rotund de 250 ml și se îndepărtează faza organică. Se evaporă din soluția acidă tot acetatul de etil rămas utilizând un evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.2). Temperatura băii de apă nu trebuie să depășească 40 °C. Sub vid la o presiune de aproximativ 25 mbar întreaga cantitate de acetat de etil rezidual se îndepărtează în 5 minute la 38 °C.

5.3. *Curățare*

5.3.1. **Pregătirea coloanei de Amberlit**

Pentru fiecare extract de eșantion se pregătește câte o coloană XAD-2. Se transferă 10 g de Amberlit preparat (punctul 3.19) într-o coloană de sticlă (punctul 4.5) cu metanol (punctul 3.8). Se adaugă un dop mic de vată de sticlă deasupra patului de rășină. Se scurge metanolul din coloană și se spală rășina cu 100 ml de apă, oprind fluxul pe măsură ce lichidul ajunge la partea superioară a patului de rășină. Se lasă coloana să se echilibreze timp de 10 minute înainte de utilizare. Niciodată nu se lasă coloana să se usuce.

5.3.2. **Curățarea eșantionului**

Se transferă cantitativ extractul (punctul 5.2) în partea superioară a coloanei de Amberlit preparată (punctul 5.3.1) și se eluează, îndepărtând apoi eluatul. Rata de eluare nu trebuie să depășească 20 ml/min. Se clătește balonul cu fund rotund cu 20 ml de acid clorhidric (punctul 3.17), apoi acesta se folosește pentru spălarea coloanei de rășină. Se suflă orice urmă de soluție acidă rămasă cu ajutorul unui curent de aer. Se îndepărtează lichidele de spălare. Se adaugă 100 ml de metanol (punctul 3.8) în coloană și se eluează 5-10 ml; se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se lasă metanolul rămas timp de 10 minute să se echilibreze cu rășina și se continuă eluarea la o rată care să nu depășească 20 ml/min, colectând eluatul în același balon cu fundul rotund. Se evaporă metanolul pe evaporatorul rotativ cu generare de film (punctul 4.2); temperatura băii de apă trebuie să nu depășească

40 °C. Se transferă cantitativ reziduul într-un balon gradat de 10 ml, utilizând faza mobilă (punctul 3.21). Se completează până la semn cu ajutorul fazei mobile și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4).

5.4. *Determinarea prin HPLC*

5.4.1. **Parametri**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1)

Fază mobilă HPLC (punctul 3.21)

Debit: 1,5-2 ml/min.

Lungimea unde de detecție: 243 nm

Volum de injecție: 40-100 μ l.

Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul 3.6.2) conținând 3,0 μ g/ml, până la obținerea de înălțimi (sau de arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.4.2. **Curba de calibrare**

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.6.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordinate și concentrațiile corespunzătoare, în μ g/ml, ca abscise.

5.4.3. **Soluția de eșantion**

Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.3.2) de mai multe ori, utilizând același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de halofuginonă.

6. **Calculul rezultatelor**

Concentrația soluției de eșantion în μ g/ml se determină plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor de halofuginonă a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2).

Conținutul de halofuginonă w (mg/kg) al eșantionului este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \cdot 10}{m} \text{ unde:}$$

c : concentrația de halofuginonă din soluția de eșantion, în µg/ml,

m : greutatea porțiunii de testat, în grame.

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.6.2), care conține 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.6.2). Cantitatea de halofuginonă adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de halofuginonă găsită în extractul de eșantion.

După luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului, crește numai înălțimea vârfului de halofuginonă. Lărgimea vârfului, la jumătate din înălțimea sa maximă, trebuie să se încadreze într-o variație de ± 10 % din lărgimea originală.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este de obicei de ± 2 nm;

(b) între 225 și 300 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;

(c) între 225 și 300 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,5 mg/kg pentru un conținut de halofugiononă de până la 3 mg/kg

7.3. *Recuperare*

Pentru eșantionul martor îmbogățit se realizează o recuperare de minimum 80 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

A fost organizat un studiu colaborativ ([26](#)) în cadrul căruia trei eșantioane au fost analizate de opt laboratoare.

Rezultate

	Eșantionul A (martor) La primire	Eșantionul B (făină)		Eșantionul C (pelete)	
		La primire	După două luni	La primire	După două luni
Medie (mg/kg)	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75
ND= nedetectat					

S_R = deviația standard a reproductibilității

CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității (%)

Rec. = recuperare %

E. DETERMINAREA ROBENIDINEI

Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidină

Conținutul de robenidină se determină prin

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de robenidină din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul se extrage cu metanol acidifiat. Extractul se usucă și o parte alicotă se curăță într-o coloană de oxid de aluminiu. Robenidina se eluează din coloană cu metanol, se concentrează și se completează până la un volum adecvat cu fază mobilă. Conținutul de robenidină se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

3. Reactivi

3.1. Metanol

3.2. Metanol acidifiat

Se transferă 4,0 ml de acid clorhidric ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) într-un balon gradat de 500 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.3. Acetonitril, de calitate HPLC

3.4. Sită moleculară

Tip 3A, 8-12 noduri ale sitei (noduri de 1,6-2,5 mm, aluminosilicat cristalin, diametrul porilor 0,3 mm).

3.5. Oxid de aluminiu, activitate acidă grad I pentru cromatografia pe coloană

Se transferă 100 g de oxid de aluminiu într-un recipient adecvat și se adaugă 2,0 ml de apă. Se închide și se agită timp de aproximativ 20 de minute. Se păstrează într-un recipient bine închis.

3.6. Soluție de fosfat diacid de potasiu, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 3,40 g de fosfat diacid de potasiu în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn și se amestecă.

3.7. Soluție de fosfat acid disodic, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 3,55 g de fosfat acid disodic anhidru (sau 4,45 g de dihidrat sau 8,95 g de dodecahidrat) în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 litru, se completează până la semn și se amestecă.

3.8. Fază mobilă HPLC

Se amestecă următorii reactivi:

650 ml de acetonitril (punctul 3.3),

250 ml apă (de calitate HPLC),

50 ml soluție de fosfat diacid de potasiu (punctul 3.6),

50 ml soluție de fosfat acid disodic (punctul 3.7).

Se trece printr-un filtru de $0,22 \mu\text{m}$ (punctul 4.6) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute).

3.9. Substanța etalon

Robenidină pură: Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidină.

3.9.1. Soluția etalon stoc de robenidină: 300 µg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 30 mg de substanță etalon de robenidină (punctul 3.9). Se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.2) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.

3.9.2. Soluția etalon intermediară de robenidină: 12 µg/ml

Se transferă 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 250 ml, se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric.

3.9.3. Soluții de calibrare

Se transferă 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 și 25,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.9.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 și 6,0 µg/ml de robenidină. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate.

3.10. Apă, de calitate HPLC

4. Aparatură

4.1. Coloană de sticlă

Construită din sticlă brună, prevăzută cu robinet de închidere și un rezervor cu capacitatea de aproximativ 150 ml, diametru interior 10-15 mm, lungime 250 mm.

4.2. Agitator mecanic sau magnetic

4.3. Evaporator rotativ cu generare de film

4.4. Echipament HPLC cu detector de radiații UV cu lungimi de undă variabile sau cu detector cu grup de diode care funcționează în intervalul 250-400 nm

4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm x 4 mm, C₁₈, particule de 10 µm sau echivalent

4.5. Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă)

4.6. Filtre cu membrană, 0,22 µm

4.7. Filtre cu membrană, 0,45 µm

5. Procedura

Notă: Robenidina este sensibilă la lumină. Pentru toate operațiile se folosește sticla brună.

5.1. Generalități

5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența robenidinei și a substanțelor interferente.

5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor (punctul 5.1.1) care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de robenidină, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 60 mg/kg, se transferă 3,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se evaporă soluția până la cca 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 15 g din furajul martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2).

Notă: Pentru această metodă, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează robenidină.

5.2. Extracție

Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 15 g de eșantion preparat. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se adaugă 100,0 ml metanol acidifiat (punctul 3.2), se închide și se agită timp de o oră în agitator (punctul 4.2). Se filtrează soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (punctul 4.5) și se colectează întregul filtrat într-un flacon tip Erlenmeyer de 150 ml. Se adaugă 7,5 g de sită moleculară (punctul 3.4), se închide și se agită timp de 5 minute. Se filtrează imediat prin hârtie de filtru din fibră de sticlă. Se conservă această soluție pentru etapa de purificare (punctul 5.3).

5.3. Purificare

5.3.1. Pregătirea coloanei de oxid de aluminiu

Se introduce un tampon mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (punctul 4.1) și se împinge utilizând o baghetă de sticlă. Se cântăresc 11,0 g din oxidul de aluminiu preparat (punctul 3.5) și se transferă în coloană. Pe parcursul acestei etape este important ca expunerea la aer să fie redusă la minimum. Se lovește ușor coloana încărcată în partea inferioară pentru a permite stabilizarea oxidului de aluminiu.

5.3.2. Purificarea eșantionului

Se transferă în coloană cu pipeta 5,0 ml de extract de eșantionul preparat în (punctul 5.2). Vârful pipetei se menține aproape de peretele coloanei și se permite ca soluția să fie absorbită de oxidul de aluminiu. Se eluează robenidina din coloană folosind 100 ml metanol (punctul 3.1), cu un debit de 2-3 ml/minut și se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se evaporă soluția de metanol până la uscare sub presiune redusă la 40 °C, prin intermediul unui evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.3). Se redizolvă reziduul în 3-4 ml de fază mobilă (punctul 3.8) și se transferă cantitativ într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul de mai multe ori cu cantități de 1-2 ml de fază mobilă și se transferă lichidul de clătire în balonul gradat. Se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4).

5.4. *Determinarea prin HPLC*

5.4.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1),

Fază mobilă HPLC (punctul 3.8),

Debit: 1,5-2 ml/min,

Lungimea de undă a detectorului: 317 nm,

Volum de injecție: 20-50 μl.

Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul 3.9.3) conținând 3,6 μg/ml, până la obținerea de înălțimi ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.4.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.9.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile sau ariile medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

5.4.3. Soluția de eșantion

Se injectează de mai multe ori extractul de eșantion (punctul 5.3.2) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de robenidină.

6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor robenidinei din soluția de eșantion se determină concentrația în $\mu\text{g/ml}$ a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2).

Conținutul de robenidină w (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare:

$$w = \frac{c \cdot 200}{m} \quad \text{unde:}$$

c = concentrația de robenidină din soluția de eșantion, în $\mu\text{g/ml}$,

m = greutatea porțiunii de testat, în grame.

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.9.3), care conține $6 \mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (punctul 3.9.3). Cantitatea de robenidină adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de robenidină constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de robenidină crește după luarea în considerare a cantității adăugate și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;

(b) între 250 și 400 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;

(c) între 250 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. *Repetabilitate*

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de robenidină mai mare de 15 mg/kg

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 85 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

A fost organizat un studiu prin colaborare la nivelul UE, în cursul căruia au fost analizate de către 12 laboratoare patru eșantioane, sub formă de făină sau de pelete, de hrană pentru păsări de curte și pentru iepuri. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Păsări de curte		Iepuri	
	Făină	Pelete	Făină	Pelete

Medie (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
Recuperare (%)	90,0	93,3	87,2	80,2
s_r = deviația standard a repetabilității s_r = coeficientul de variație a repetabilității, % S_R = deviația standard a reproductibilității CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, (%)				

F. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE DICLAZURIL

(+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2il)fenil]-acetonitril.

Conținutul de diclazuril se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de diclazuril din furaje combinate și preamestecuri. Limita de detecție este de 0,1 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 0,5 mg/kg. Limite de cuantificare mai mici sunt realizabile, dar acest lucru trebuie validat de către utilizator.

2. Principiu

După adăugarea unui standard intern, eșantionul este extras cu metanol acidifiat. Pentru furaje, o parte alicotă a extractului este purificată pe un cartuş C18 pentru extracție în fază solidă. Diclazurilul este eluat din cartuş cu un amestec de metanol acidifiat și apă. După evaporare, reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Pentru preamestecuri, extractul se evaporă și reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Conținutul de diclazuril se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu gradient ternar și cu fază inversată, prin utilizarea unui detector UV.

3. Reactivi

3.1. Apă, de calitate HPLC

3.2. Acetat de amoniu

3.3. Sulfat acid de tetrabutilamoniu (TBHS)

3.4. Acetonitril, de calitate HPLC

3.5. Metanol, de calitate HPLC

3.6. N,N-dimetilformamidă (DMF)

3.7. Acid clorhidric, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Substanță etalon: diclazuril: (+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro3,5 - dioxo-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril, cu puritate garantată

3.8.1. Soluție etalon stoc de diclazuril, 500 $\mu\text{g/ml}$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de diclazuril (punctul 3.8) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.8.2. Soluția etalon de diclazuril, 50 $\mu\text{g/ml}$

Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.9. Substanță etalon intern: 2,6 diclor- α -(4-clorfenil)-4-[4,5-dihidro3,5 -dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H)-il] α -metilbenzen-acetonitril (diclazuril de metil)

3.9.1. Soluție etalon stoc internă de diclazuril, 500 $\mu\text{g/ml}$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon internă (punctul 3.9) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.9.2. Soluție etalon intern, 50 $\mu\text{g/ml}$

Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc internă de etalon intern (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.9.3. Soluție etalon intern pentru preamestecuri, p/1 000 mg/ml (p = conținutul nominal de diclazuril în preamestec în mg/kg)

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, p/10 mg de substanță etalon intern într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în DMF (punctul 3.6) într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.7), se completează până la semn cu DMF și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.10. Soluții de calibrare

3.10.1. Soluție de calibrare, 1 $\mu\text{g/ml}$ (diclazuril)

Se pipetează 1,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 17 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.2. Soluție de calibrare, 2 $\mu\text{g/ml}$ (diclazuril)

Se pipetează 2,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 16 ml

de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.3. Soluție de calibrare, 3 µg/ml (diclazuril)

Se pipetează 3,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 15 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.4. Soluție de calibrare, 4 µg/ml (diclazuril)

Se pipetează 4,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 14 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.5. Soluție de calibrare, 5 µg/ml (diclazuril)

Se pipetează 5,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 13 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

Notă: soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) acoperă concentrația de diclazuril din hrana pentru animale cuprinsă între 0,5 și 2,5 mg/kg atunci când se utilizează protocolul actual.

3.11. Cartuș C₁₈ pentru extracție în fază solidă, de exemplu Bond Elut, mărime: 20 cc, greutatea absorbentului: 5 000 mg (precondiționare în conformitate cu orientările furnizorului).

3.12. Solvent de extracție: metanol acidifiat.

Se pipetează 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.7) în 1 000 ml de metanol (punctul 3.5) și se amestecă.

3.13. Fază mobilă pentru HPLC

3.13.1. Eluent A: acetat de amoniu – soluție de sulfat acid de tetrabutilamoniu.

Se dizolvă 5 g de acetat de amoniu (punctul 3.2) și 3,4 g de TBHS (punctul 3.3) în 1 000 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (punctul 3.4).

3.13.3. Eluent C: metanol (punctul 3.5).

4. Aparatură

4.1. Agitator mecanic

4.2. Echipament pentru HPLC cu gradient ternar:

4.2.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, Hypersil ODS, particule de 3 μm , 100 mm $\times$ 4,6 mm sau echivalent

4.2.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode

4.3. Evaporator rotativ cu generare de film

4.4. Filtru cu membrană (de exemplu, nailon cu rezistență chimică), 0,45 μm

4.5. Seringă de unică folosință, 5 ml

4.6. Distribuitor în vid

4.7. Baie cu ultrasunete

5. Procedura

5.1. Generalități

5.1.1. Furaj martor

Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența diclazurilului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar prin analiză nu se detectează nici diclazuril, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de diclazuril, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 1 mg/kg, se adaugă 0,1 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) la 50 g din furajul martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a continua (punctul 5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat se îmbogățește adăugând o cantitate de diclazuril similară celei deja prezente în eșantion. Acest eșantion este

analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea poate fi calculată prin diferență.

5.2. Extracție

5.2.1. Pui de carne

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 50 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 20 ml din supernatant într-un recipient de sticlă adecvat și se diluează în 20 ml apă (punctul 3.1). Se transferă această soluție într-un cartuș de extracție (punctul 3.11) și se trece prin acesta prin aplicare de vid (punctul 4.6). Se spală cartușul cu 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă (punctul 3.1), 65 + 35 (V + V). Se elimină fracțiunile colectate și se eluează compușii cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă, 80 + 20 (V + V). Se evaporă această fracțiune până la uscare prin intermediul evaporatorului rotativ (punctul 4.3) la 60 °C. Se dizolvă reziduul în 1,0 ml DMF (punctul 3.6), se adaugă 1,5 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se filtrează printr-un filtru cu membrană (punctul 4.4) montat pe o seringă de unică folosință (punctul 4.5). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, aproximativ 1 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.3), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000 /p ml (p = conținutul nominal în diclazuril al preamestecului în mg/kg) din supernatant într-un balon cu fund rotund de dimensiuni adecvate. Se evaporă acest amestec până la uscare, la presiune scăzută și la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator rotativ (punctul 4.3). Se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de DMF (punctul 3.6), se adaugă 15,0 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.3. Determinarea prin HPLC

5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente sau mai bune.

— Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm Hypersil ODS, particule de 3 μm sau echivalent.

— Fază mobilă

— Eluent A [3.13.1]: Soluție apoasă de acetat de amoniu și sulfat acid de tetrabutilamoniu.

— Eluent B [3.13.2]: acetonitril.

— Eluent C [3.13.3]: metanol.

— Mod de eluare - gradient liniar

— condiții inițiale: $A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)$;

— după 10 min, eluția gradientului timp de 30 de minute până la: $A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)$;

— se clătește apoi cu B timp de 10 minute.

— Debit: 1,5-2 ml/min

— Volum de injecție: 20 μl

— Lungimea de undă a detectorului: 280 nm.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.2) care conține 2 μg/ml de diclazuril sau etalon intern, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. Analiza cromatografică a soluțiilor de calibrare

Se injectează de două ori 20 μl din fiecare soluție de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.3, 3.10.4, 3.10.5 și 3.10.2), se identifică și se integrează vârfurile diclazurilului și etalonului intern și se trasează curba de calibrare pe baza raportului dintre înălțimea medie a vârfului sau aria diclazurilului și înălțimea medie a vârfului sau aria etalonului intern în raport cu concentrația de diclazuril în soluțiile de calibrare (μg/ml).

5.3.3. Analiza cromatografică a soluțiilor eșantion

Se injectează 20 µl din soluția de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de două ori și se determină înălțimea medie sau aria vârfurilor de diclazuril și a vârfurilor etalonului intern.

6. Calculul rezultatelor

6.1. *Pui de carne*

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\text{Înălțimea}(d,s)}{\text{Înălțimea}(i,s)} - b}{a} \frac{10V}{m} \text{ sau}$$

$$w = \frac{\frac{\text{Area}(d,s)}{\text{Aria}(i,s)} - b}{a} \frac{10V}{m}$$

unde:

— $\text{Înălțimea}(d,s)$ este înălțimea vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— $\text{Aria}(d,s)$ este aria vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— $\text{Înălțimea}(i,s)$ este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— $\text{Aria}(i,s)$ este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— m este masa porțiunii de testat, în grame

— V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu 5.2.1 (adică 2,5 ml)

6.2. *Preamestecuri*

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\hat{\text{Înălțimea(d,s)}}{\hat{\text{Înălțimea(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}}$$

· p sau

$$w = \frac{\frac{\text{Aria(d,s)}}{\text{Aria(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}$$

· p

unde:

— Înalțimea(d,s) este înălțimea vârfului de diclauril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Aria(d,s) este aria vârfului de diclauril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Înalțimea(i,s) este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Aria(i,s) este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10. 2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2

— a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— m este masa porțiunii de testat, în grame

— V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu punctul 5.2.2 (adică 25 ml)

— p este conținutul nominal de diclauril al preamestecului în mg/kg

7. Validarea rezultatelor

7.1. *Identitate*

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) și ale soluției de calibrare (punctul 3.10.2).

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități adecvate din soluția de calibrare (punctul 3.10.2). Cantitatea de diclazuril adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de diclazuril constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de diclazuril și a vârfului etalonului intern crește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze în $\pm 10 \%$ din lărgimea inițială a vârfului de diclazuril sau a vârfului etalonului intern al extractului de eșantion neîmbogățit.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de $\pm 2 \text{ nm}$.

(b) Între 230 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon.

(c) Între 230 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două măsurători independente efectuate pe două subeșantioane nu trebuie să depășească:

- 30 % din valoarea superioară pentru un conținut în diclazuril situat între 0,5 mg/kg și 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg pentru un conținut în diclazuril situat între 2,5 mg/kg și 5 mg/kg,
- 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de diclazuril mai mare de 5 mg/kg

7.3. *Recuperare*

Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %.

8. *Rezultatele unui studiu colaborativ*

Au fost organizate două studii colaborative. În primul, efectuat de un alt grup de laboratoare în 1994, eșantioanele analizate au fost două preamestecuri (O 100, A 100) și trei eșantioane de furaje complementare pentru păsări de curte (L1, Z1, K1). Un eșantion de preamestec a fost amestecat cu o matrice organică (O 100), iar celălalt cu o matrice anorganică (A 100). Conținutul teoretic este de 100 mg de diclazuril pe kg. Laboratoarele au primit instrucțiuni să analizeze fiecare eșantion o singură dată sau în duplicat. (Informații detaliate privind primul studiu colaborativ figurează în *Journal of AOAC International*, vol. 77, nr. 6, 1994, p. 1359-1361).

În al doilea studiu colaborativ au fost analizate trei furaje combinate pentru păsări de curte, care conțin diclazuril în concentrații de 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) și furajul martor (MAT 3). (Informații detaliate privind al doilea studiu figurează în *JRC Technical report* (2016) și în *Journal of AOAC International*, vol. 102, nr. 2, 2019, p. 646-652). Rezultatele celor două studii colaborative sunt prezentate în tabelul următor.

	Eșantion n 1A 100	Eșantion n 2O 100	Eșantion n 3 L1	Eșantion n 4 Z1	Eșantion n 5 K1	Eșantion n 6 MAT 1	Eșantion n 7 MAT 2	Eșantion n 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Medie (mg/kg))	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ

S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referință ^(*)	Primul studiu din 1 994	Primul studiu din 1 994	Primul studiu din 1 994	Primul studiu din 1 994	Primul studiu din 1 994	Al doilea studiu din 2 015	Al doilea studiu din 2 015	Al doilea studiu din 2 015

(*)

Primul studiu din 1994: Journal of AOAC International, Volumul 77, No 6, 1994, p. 1359-1361; Al doilea studiu din 2015: JRC Technical report „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study” (2016).

L = număr de laboratoare

n = număr de valori unice

S_r = deviația standard a repetabilității

CV_r = coeficientul de variație a repetabilității

S_R = deviația standard a reproductibilității

CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității

LOQ = Limita de cuantificare

9. Observații generale

Trebuie să se demonstreze în prealabil că reacția diclazurilului este liniară pentru toată gama de concentrații măsurate.

Cel puțin pentru analiza diclazurilului din furajele combinate cu un conținut ridicat de grăsime (în acest scop, care depășește 12 % grăsime), metoda analitică poate fi înlocuită cu alte metode bazate pe HPLC, de exemplu o cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS), cu condiția ca metoda alternativă să aibă caracteristici de performanță echivalente (rata de recuperare, precizia la condițiile de repetabilitate și reproductibilitate).

G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE LASALOCID SODIC

Sare sodică a unui acid monocarboxilic polietar, produsă de Streptomyces lasaliensis.

Conținutul de lasalocid sodic se determină prin

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector spectrofluorimetric (fluorescență), astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului în lasalocid sodic din furaje. Limita de detecție este de 5 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 10 mg/kg

2. Principiu

Lasalocidul sodic este extras din eșantion cu metanol acidifiat și dozat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector spectrofluorimetric (fluorescență).

3. Reactivi

3.1. Fosfat diacid de potasiu (KH_2PO_4)

3.2. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 %

3.3. Soluție de acid ortofosforic, c = 20 %

Se diluează 23,5 ml acid ortofosforic (punctul 3.2) în 100 ml de apă.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilhexilamină), g (g/g) = 99 %

3.5. Metanol, de calitate HPLC

3.6. Acid clorhidric, densitate = 1,19 g/ml

3.7. Soluție tampon de fosfat, c = 0,01 mol/l

Se dizolvă 1,36 g de KH_2PO_4 (punctul 3.1) în 500 ml de apă (punctul 3.11), se adaugă 3,5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.2) și 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamină (punctul 3.4). Se ajustează pH-ul la 4,0 cu ajutorul soluției de acid ortofosforic (punctul 3.3) și se diluează cu apă completându-se până la 1 000 ml (punctul 3.11).

3.8. Metanol acidifiat

Se transferă 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.6) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.5) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.9. Fază mobilă HPLC, soluție tampon de fosfat și metanol 5 + 95 (V + V)

Se amestecă 5 ml de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) cu 95 ml de metanol (punctul 3.5).

3.10. Substanță etalon de lasalocid sodic cu puritate garantată, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de *Streptomyces lasaliensis*), E 763

3.10.1. Soluție etalon stoc de lasalocid sodic, 500 $\mu\text{g/ml}$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sodic (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.8), se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid sodic, 50 $\mu\text{g/ml}$

Se pipetează 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.

3.10.3. Soluții de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.10.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu

metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 μg de lasalocid sodic pe ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare.

3.11. Apă, de calitate HPLC

4. Aparatură

4.1. Baie cu ultrasunete (sau baie de apă cu agitare) cu reglaj de temperatură

4.2. Filtre cu membrană, 0,45 μm

4.3. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 20 μl.

4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm × 4 mm, cu fază inversată C₁₈, particule de 5 μm sau echivalent

4.3.2. Spectrofluorimetru cu ajustare variabilă a lungimii de undă pentru excitație și emisie

5. Procedura

5.1. Generalități

5.1.1. Furaj martor

Pentru a efectua testul de recuperare (punctul 5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența lasalocidului sodic și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu se detectează nici lasalocid sodic, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de lasalocid sodic, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la 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 mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (punctul 5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de lasalocid

sodic asemănătoare celei deja prezente în eșantion. Acesta este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea se poate calcula prin diferență.

5.2. *Extracție*

5.2.1. Pentru porcine

Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, de la 5 la 10 g de eșantion într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml cu dop. Se picură cu pipeta 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8). Se închide ușor și se agită circular pentru a se dispersa. Flaconul se plasează într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.2) într-un recipient adecvat. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 2 g de preamestec nemăcinat într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8) și se agită circular pentru a se dispersa. Se pune balonul și conținutul acestuia într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, apoi se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă bine. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.2). Se diluează un volum adecvat de filtrat limpede cu metanol acidifiat (punctul 3.8), pentru a produce o soluție de testat finală care să conțină aproximativ 4 μg/ml de lasalocid sodic. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.3. *Determinarea prin HPLC*

5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.3.1):	125 mm × 4 mm, cu fază inversată C ₁₈ , particule de 5 µm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.9):	amestec de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) și metanol (punctul 3.5), 5 + 95 (V + V)
Debit:	1,2 ml/min
Lungimea undelor de detecție:	Excitație: 310 nm
	Emisie: 419 nm
Volum de injecție:	20 µl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.3) conținând 4,0 µg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.3.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.10.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând valorile (ariile) medii ale vârfurilor ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

5.3.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori utilizând același volum cu cel reținut pentru soluția de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de lasalocid sodic.

6. Calculul rezultatelor

Plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor soluției de eșantion (punctul 5.3.3), se determină concentrația de lasalocid sodic (µg/ml) prin referire la curba de calibrare.

6.1. *pentru porcine*

Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{c V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

unde:

c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.1) în μg/ml

V₁ = volumul extractului de eșantion conform 5.2.1 în ml (adică 100)

m = greutatea porțiunii de testat, în g

6.2. *Preamestecuri*

Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{c V_2 \cdot f}{m} [\text{mg/kg}]$$

unde:

c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.2) în μg/ml

V₂ = volumul extractului de eșantion conform 5.2.2 în ml (adică 250)

f = factorul de diluție conform 5.2.2

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. **Validarea rezultatelor**

7.1. *Identitate*

Metodele bazate pe spectrofluorimetrie sunt mai puțin supuse interferențelor decât cele care utilizează un detector UV. Identitatea analitului poate fi confirmată de către co-cromatografie.

7.1.1. **Co-cromatografie**

Un extract de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.10.3). Cantitatea de lasalocid sodic adăugată trebuie să fie asemănătoare cantității de lasalocid sodic constatată în extractul de eșantion. Numai înălțimea vârfului corespunzător lasalocidului sodic se mărește după ce s-a luat în calcul cantitatea de lasalocid sodic adăugată și diluția extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii, trebuie să se încadreze între ± 10 % din lărgimea inițială a vârfului produs de extractul de eșantion neîmbogățit.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 30 mg/kg și 100 mg/kg;

— 15 mg/kg pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 100 mg/kg și 200 mg/kg;

— 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic mai mare de 200 mg/kg.

7.3. Recuperare

Pentru un eșantion de furaj (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. Pentru eșantioanele de preamestecuri îmbogățite, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate 2 preamestecuri (eșantioanele 1 și 2) și 5 furaje (eșantioanele 3-7) de către 12 laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion ul 1 Preames tec pentru pui	Eșantion ul 2 Preames tec pentru curcani	Eșantio nul 3 Pelete pentru curcani	Eșantion ul 4 Sfărâmăt uri pentru pui	Eșantio nul 5 Furaje pentru curcani	Eșantio nul 6 Furaje pentru păsări de curte A	Eșantio nul 7 Furaje pentru păsări de curte B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23

Medie (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Conținut nominal (mg/kg)	5 000 ^(*)	16 000 ^(*)	80 ^(*)	105 ^(*)	120 ^(*)	50 ^(*)	35 ^(*)

(*) *Analyst*, 1995, 120, p. 2 175-2 180.

(*) Conținutul declarat de producător.

(*) Furaj preparat în laborator.

L = număr de laboratoare.

n = număr de valori unice.

s_r = deviația standard a repetabilității.

s_R = deviația standard a reproductibilității.

CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, %.

CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %.

H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CLORHIDRAT DE AMPROLIU

clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu monoclorhidrat

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de amproliu din furaje. Limita de detecție este de 1 mg/kg, limita de cuantificare este de 5 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul este extras cu un amestec de metanol și apă. După diluarea cu fază mobilă și filtrarea prin membrană, conținutul de amproliu se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu schimb de cationi, utilizând un detector UV.

3. Reactivi

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, de calitate HPLC

3.3. Apă, de calitate HPLC

3.4. Soluție de fosfat diacid de sodiu, $c = 0,1 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 13,80 g de fosfat diacid de sodiu în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă.

3.5. Soluție de perclorat de sodiu, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Se dizolvă 224,74 g de perclorat de sodiu monohidrat în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă.

3.6. Fază mobilă pentru HPLC (a se vedea observația de la punctul 9.1).

Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Înainte de utilizare, se filtrează printr-un filtru cu membrană de $0,22 \mu\text{m}$ (punctul 4.3) și se degazează soluția [de exemplu, într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4) timp de cel puțin 15 minute].

3.7. Substanță etalon: amproliu pur, clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu, E 750 (a se vedea punctul 9.2)

3.7.1. Soluție etalon stoc de amproliu, $500 \mu\text{g/ml}$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de amproliu (punctul 3.7) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în 80 ml de metanol (punctul 3.1) și se plasează balonul timp de 10 minute într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4). După tratamentul cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. La o temperatură de $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.7.2. Soluție etalon intermediară de amproliu, 50 µg/ml

Se pipetează 5,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu solvent de extracție (punctul 3.8) și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.7.3. Soluții de calibrare

Se transferă 0,5, 1,0 și 2,0 ml din soluția etalon intermediară (punctul 3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.6) și se amestecă. Aceste soluții corespund la 0,5, 1,0 și respectiv 2,0 µg de amproliu per ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare.

3.8. Solvent de extracție

Amestec de metanol (punctul 3.1) și apă 2 + 1 (v + v)

4. Aparatură

4.1. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 100 µl

4.1.1. Coloană pentru cromatografie lichidă de 125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 µm sau echivalent

4.1.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode

4.2. Filtru cu membrană, material PTFE, de 0,45 µm

4.3. Filtru cu membrană, 0,22 µm

4.4. Baie cu ultrasunete

4.5. Agitator mecanic sau magnetic

5. Procedura

5.1. *Generalități*

5.1.1. Furaj martor

Pentru efectuarea testului de recuperare (punctul 5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența amproliului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze amproliu sau substanțe interferente.

5.1.2. Testul de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de amproliu similară celei prezente în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.7.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 min, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (punctul 5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de amproliu similară cu cea deja prezentă în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit și recuperarea poate fi calculată prin scădere.

5.2. *Extracție*

5.2.1. Preamestecuri (conținut de amproliu < 1 %) și furaje

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, între 5 și 40 g de eșantion, în funcție de conținutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml de solvent de extracție (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obține un conținut de amproliu între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă (a se vedea observația de la 9.3). Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.2.2. Preamestecuri (conținut de amproliu ≥ 1 %)

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 1-4 g de preamestec, în funcție de conținutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml solvent de extracție (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obține un conținut de amproliu între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă. Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.3. *Determinarea prin HPLC*

5.3.1. **Parametri:**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.6):	Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Debit:	0,7 -1 ml/min
Lungimea unde de detecție:	264 nm
Volum de injecție:	100 μl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.7.3) care conține 1,0 μg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. **Curba de calibrare**

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordinate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

5.3.3. **Soluția de eșantion**

Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.2) de mai multe ori folosind același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu.

6. **Calculul rezultatelor**

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu din soluția de eșantion se determină concentrația în $\mu\text{g/ml}$ a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.3.2).

Conținutul w de amproliu al eșantionului, exprimat în mg/kg , este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{V \cdot c \cdot f}{m} [\text{mg/kg}] \quad \text{unde:}$$

V =volumul solventului de extracție (punctul 3.8), în ml , conform 5.2 (adică 200 ml)

c =concentrația de amproliu din extractul de eșantion (punctul 5.2), în $\mu\text{g/ml}$

f = factorul de diluție conform 5.2

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (punctul 5.2) și ale soluției de calibrare (punctul 3.7.3), care conține 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (punctul 5.2) se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (punctul 3.7.3). Cantitatea de amproliu adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de amproliu constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de amproliu se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze într-o variație de $\pm 10 \%$ din lărgimea inițială a vârfului de amproliu din extractul de eșantion neîmbogățit.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de ± 2 nm.

(b) Între 210 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon.

(c) Între 210 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

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 același eșantion nu trebuie să depășească:

- 15 % din rezultatul superior pentru un conținut de amproliu situat între 25 mg/kg și 500 mg/kg;
- 75 mg/kg pentru un conținut de amproliu situat între 500 mg/kg și 1 000 mg/kg;
- 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de amproliu mai mare de 1 000 mg/kg.

7.3. Recuperare

Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate trei tipuri de hrană pentru păsări de curte (eșantioanele 1-3), un furaj mineral (eșantionul 4) și un preamestec (eșantionul 5). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșantion 1 (furaj martor)	Eșantion 2	Eșantion 3	Eșantion 4	Eșantion 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medie (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
conținut nominal [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000
L: număr de laboratoare n: număr de valori unice s _r : deviația standard a repetabilității CV _r : coeficientul de variație a repetabilității s _R : deviația standard a reproductibilității CV _R : coeficientul de variație a reproductibilității					

9. Observații

9.1. Dacă eșantionul conține tiamină, vârful tiaminei din cromatogramă apare puțin înaintea vârfului de amproliu. Conform acestei metode, amproliul și tiamina trebuie să fie separate. Dacă amproliul și tiamina nu sunt separate de coloana (punctul 4.1.1) utilizată în această metodă, se înlocuiește cu metanol până la 50 % din porția de acetonitril a fazei mobile (punctul 3.6).

9.2. Conform Farmacopeei Britanice, spectrul soluției de amproliu ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) în acid clorhidric ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) prezintă valori maxime la 246 nm și 262 nm. Absorbanța este de 0,84 la 246 nm și de 0,80 la 262 nm.

9.3. Extractul trebuie să fie întotdeauna diluat cu faza mobilă, altfel timpul de reținere al vârfului de amproliu se poate schimba în mod semnificativ din cauza variațiilor forței ionice.

I. DETERMINAREA NARAZINULUI

Conținutul de nazarin se determină prin

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană

J. DETERMINAREA NICARBAZINULUI

Conținutul de nicarbazin se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN 15782:2017 Hrană pentru animale – Determinarea nicarbazinului – Metodă cromatografică lichidă de înaltă performanță.

K. DETERMINAREA DECOCHINATULUI

Conținutul de decochinat se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor

autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau

— metoda prevăzută de SM EN 16162:2017 Hrană pentru animale – Determinarea decochinatului prin HPLC cu detectarea fluorescenței.

L. DETERMINAREA MONENSINULUI

Conținutul de monensin se determină prin

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomicină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană.

M. DETERMINAREA SALINOMICINULUI

Conținutul de salinomicin se determină prin

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomicină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană.

N. DETERMINAREA SEMDURAMICINULUI

Conținutul de semduramicin se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 16158 Hrană pentru animale – Determinarea conţinutului de semduramicin – Metodă cromatografică lichidă prin utilizarea unei abordări de tip „ramificat”.

O. STANDARDE SM EN

Pentru aplicarea art. 32 alin. (2) lit. (a) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, sunt relevante următoarele standarde SM EN:

SM EN ISO 30024:2024 Hrană pentru animale – Determinarea activităţii fitazei

SM EN 17050:2018 Hrană pentru animale – Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea iodului din furaje prin ICP-MS

SM EN 17550:2022 Hrană pentru animale: Determinarea carotenoidelor în furajele combinate şi în preamestecuri prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie UV (HPLC-UV)

SM EN 15784:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea *Bacillus* spp.

SM EN 15785:2017 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Izolarea şi enumerarea *Bifidobacterium* spp.

SM EN 15786:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea *Pediococcus* spp.

SM EN 15787:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea *Lactobacillus* spp. utilizat ca aditiv furajer

SM EN 15788:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. utilizat ca aditiv furajer

SM EN 15789:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea *Saccharomyces cerevisiae* utilizată ca aditiv furajer

SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt și molibden)

SM EN 15621:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES (pentru analiza aditivului furajer cobalt)

SM EN 16159:2017 Hrană pentru animale – Determinarea seleniului prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen) (pentru analiza aditivului furajer seleniu)

SM EN 17053:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă) (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt, molibden și seleniu).

Anexă nr.5

la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL SUBSTANȚELOR NEDORITE DIN FURAJE

A. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI

Capitolul nr.1

METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE INTERPRETARE A REZULTATELOR ANALITICE

1. Domeniu de aplicare și definiții

Eșantioanele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați de tipul dioxinelor (PCB-uri) ([29](#)) și PCB-uri care nu sunt de tipul

dioxinelor din furaje sunt prelevate în conformitate cu dispozițiile din anexa nr. 1 . Se aplică cerințele cantitative privind controlul substanțelor sau produselor repartizate uniform în furaje, așa cum sunt prevăzute la punctul 5.1 din anexa nr.1. Eșantioanele agregat astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în eşantioanele de laborator se stabilește dacă se respectă nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020.

În sensul prezentei părți, se aplică definițiile menționate la Norma sanitară veterinară privind metodele analitice pentru reziduurile de substanțe farmacologic active utilizate la animalele de la care se obțin produse alimentare și la interpretarea rezultatelor, aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 721/2023.

În plus față de aceste definiții, în sensul prezentei părți se aplică următoarele definiții:

„Metode de screening” înseamnă metode utilizate pentru selectarea eşantioanelor cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Ele permit o capacitate sporită de analiză a eşantioanelor, eficiență din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau metode GC-MS. Rezultatele de la eşantioanele care depășesc valoarea-limită utilizată pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală printr-o metodă de confirmare.

„Metode de confirmare” înseamnă metode care furnizează informații complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la pragul maxim sau, la nevoie, la pragul de acțiune. Aceste metode utilizează cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GC-HRMS) sau cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS).

2. Conformitatea lotului sau a sublotului cu nivelul maxim

2.1. *În ceea ce privește PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor*

Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul analitic al sumei PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180 (PCB-uri care nu

sunt de tipul dioxinelor) nu depășește nivelul maxim prescris la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă (³¹). Lotul sau sublotul nu respectă nivelul maxim prescris la aceeași hotărâre în cazul în care media celor două rezultate analitice ale estimării superioare (³²) obținută printr-o analiză duplicat (³³), luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă, depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, adică, pentru a evalua conformitatea, se folosește concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă.

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate pentru o a doua expertiză sau pentru referință, se aplică reglementările naționale.

2.2. Referitor la PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor

Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul unei singure analize

— efectuate printr-o metodă de screening, cu o rată a rezultatelor fals conforme sub 5 %, indică faptul că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020;

— efectuate printr-o metodă de confirmare, nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă.

Pentru testele de screening, se stabilește o valoare-limită pentru deciziile privind conformitatea eșantioanelor cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD-uri/PCDF-uri, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor.

Lotul sau sublotul este considerat neconform cu nivelul maxim conform Cerințelor sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020 dacă media celor două rezultate analitice ale estimării superioare obținute în urma unei analize duplicat depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă, adică pentru a evalua conformitatea, este utilizată concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă.

Incetitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim.

Se utilizează suma incertitudinilor extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau pentru referință, se aplică reglementările naționale.

3. Rezultate care depășesc pragurile de acțiune stabilite la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020

Pragurile de acțiune servesc ca instrument pentru selectarea eșantioanelor în cazurile în care este necesar să se identifice o sursă de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor eșantioane. În cazul în care sunt necesare eforturi importante pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea, s-ar putea să fie adecvat să se confirme depășirea pragurilor de acțiune printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă .

Capitolul nr. 2

PREGĂTIREA EȘANTIOANELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. Domeniu de aplicare

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCDD/PCDF substituite la pozițiile 2,3,7,8 și PCB-uri de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea eșantioanelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

Monitorizarea prezenței PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în furaje poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode analitice:

(a) *Metode de screening*

Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor eșantioane cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Metodele de screening trebuie să garanteze o capacitate sporită de analiză a eșantioanelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Aplicarea lor trebuie să urmărească evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS.

Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare-limită, determinând o decizie de tip da/nu în legătură cu eventuala depășire a nivelului maxim sau a pragului de acțiune. Concentrația PCDD-urilor/PCDF-urilor și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din eșantioanele suspectate a fi neconforme cu nivelul maxim trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare.

În plus, metodele de screening pot oferi o indicație a nivelului de PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prezente în probă. În cazul aplicării metodelor bioanalitice de screening, rezultatul se exprimă ca echivalente bioanalitice (BEQ), iar în cazul aplicării metodelor GC-MS fizico-chimice se exprimă ca echivalente toxice (TEQ). Rezultatele exprimate numeric ale metodelor de screening sunt utile pentru a dovedi conformitatea sau suspiciunea de neconformitate sau depășirea pragurilor de acțiune și oferă o indicație a intervalului în care se situează nivelurile în vederea monitorizării prin metode de confirmare. Acestea nu sunt adecvate pentru scopuri precum evaluarea nivelurilor de fond, aprecierea prelevării, urmărirea

tendințelor pe care le urmează nivelurile în timp sau reevaluarea pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime.

(b) Metode de confirmare

Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații deplină la nivel de congeneri individuali. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a pragurilor de acțiune, inclusiv confirmarea rezultatelor obținute prin metodele de screening. În plus, rezultatele pot fi folosite și pentru alte scopuri, precum determinarea nivelurilor de fond scăzute în monitorizarea furajelor, urmărirea tendințelor în timp, evaluarea expunerii și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru a confirma respectarea sau nerespectarea nivelului maxim, se poate utiliza, de asemenea, GC-MS/MS.

2. Context

Pentru calcularea concentrațiilor echivalentelor toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător (a se vedea nota de subsol 1 de la capitolul nr.1) și apoi se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri.

În sensul prezentei părți A, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener individual înseamnă conținutul minim al unui analit care poate fi măsurat cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute la nivel internațional, de exemplu, SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS).

Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi identificată drept:

- (a) concentrația unui analit din extractul unui eșantion care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie monitorizată printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul de date primare cel mai puțin intens; sau
- (b) în cazul în care, din motive tehnice, calculul raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile, punctul cel mai mic de concentrație de pe o curbă de calibrare care oferă o deviație acceptabilă ($\leq 30\%$) și coerentă (măsurată cel puțin la

începutul și la sfârșitul unei serii analitice de eșantioane) de la factorul de răspuns relativ mediu calculat pentru toate punctele de pe curba de calibrare pentru fiecare serie de eșantioane. Limita de cuantificare (LOQ) se calculează de la cel mai mic punct de concentrație ținând seama de recuperarea etaloanelor interne și de prelevarea de eșantioane.

Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație (³⁸) a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ) pentru a ține cont de faptul că nu toți compușii prezenți într-un extract de probă care produce un răspuns în cadrul testului pot să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ.

Metodele de screening și de confirmare pot fi aplicate pentru controlul unei anumite matrice numai dacă metodele sunt suficient de sensibile pentru a detecta în mod fiabil niveluri la pragul de acțiune sau nivelul maxim.

3. Cerințe de asigurare a calității

3.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză.

3.2. Eșantioanele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe.

3.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj.

3.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu care s-a dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm). Probele se usucă înainte de mărunțire, dacă conținutul de umiditate este prea mare.

3.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ.

3.6. Se realizează o analiză-martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.

3.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se verifica dacă sunt liberi de compuși care perturbă

detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD-uri/PCDF-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia.

3.8. Cantitatea de probă utilizată pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile nivelurilor maxime sau pragul de acțiune.

3.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional, și anume SM EN ISO 6498:2016.

4. Cerințe pentru laboratoare

4.1. În conformitate cu dispozițiile Legii 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul SM ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului SM EN ISO/IEC 17025:2018. Trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCDD/F-urilor și a PCB-urilor ([39](#)).

4.2. Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de furaje și în intervalele de concentrații relevante.

4.3. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare, atât pentru controlul calității, cât și pentru confirmarea rezultatului analitic al probelor suspectate.

5. Cerințe de bază privind procedura analitică pentru dioxine (PCDD/F-uri) și PCB-uri de tipul dioxinelor

5.1. Intervalul de lucru la niveluri mici și limitele de cuantificare

Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt de ordinul femtogramelor (10-15g), extremitatea superioară a intervalului, din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este deja suficientă. Pentru măsurarea congenerilor

PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor substituiți non-orto), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor (10-12g). Pentru toți ceilalți congeneri PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este suficientă.

5.2. *Selectivitate (specificitate) mare*

5.2.1. Este necesar să se facă o distincție între PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași și care pot să interfereze, prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele GC-MS, este necesar să se facă deosebirea între diferiții congeneri, cum ar fi între cei toxici (de exemplu, cele 17 PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și cele 12 PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri.

5.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate fals neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate fals conforme.

5.3. *Acuratețe ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului)*

5.3.1. Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea ridicată este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unei probe din cauza fiabilității reduse a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin *autenticitate* (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit pe un material certificat și valoarea sa certificată, exprimată ca procent din această valoare) și *precizie* (deviația standard relativă RSD_R calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate).

5.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de calibrare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de determinarea-martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin metoda de confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și antagoniste), calitatea de ajustare a curbei sau diferențele dintre valorile factorilor de echivalență toxică (TEF) și ale potenței relative (REP). Recuperarea aparentă a

biotestului se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului de interes.

5.4. *Validarea în intervalul nivelului maxim și măsuri generale de control al calității*

5.4.1. Laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului maxim, de exemplu, 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim, cu un coeficient de variație acceptabil pentru analize repetate, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină.

5.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale matorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică graficele de control al calității pentru controalele matorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.

5.5. *Limita de cuantificare*

5.5.1. Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea limitei de cuantificare (LOQ) nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să dovedească că se poate face distincție între valoarea-martor și valoarea-limită. La furnizarea unui nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Nivelul de raportare se dovedește a fi diferit de probele-martor din cadrul procedurii cel puțin cu un factor de trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test-martor.

5.5.2. Limita de cuantificare (LOQ) pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. *Criterii analitice*

Pentru rezultate fiabile în urma metodelor de confirmare sau de screening, trebuie să fie respectate următoarele criterii în intervalul nivelului maxim pentru valoarea TEQ sau, respectiv, BEQ, indiferent dacă este determinată ca TEQ total sau BEQ total (ca sumă de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor) sau separat pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor:

	Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare
Rată fals conforme ^(*)	< 5 %	
Autenticitate		între -20 % și 20 %
Repetabilitate (RSD _r)	< 20 %	
Precizie intermediară (RSD _R)	< 25 %	< 15 %
(*) În raport cu nivelurile maxime.		

5.7. Cerințe specifice pentru metodele de screening

5.7.1. Pot fi folosite pentru screening atât metodele GC-MS, cât și metodele bioanalitice. Pentru metodele GC-MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7.

5.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare.

5.7.3. Performanța metodei de screening trebuie verificată în timpul analizei de rutină, printr-un control al calității analizelor și printr-o validare continuă a metodei. Trebuie să existe un program continuu pentru controlul rezultatelor conforme.

5.7.4. Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității:

20 % din extractele de probe sunt măsurate în screeningul de rutină cu și fără 2,3,7,8-TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de pragul de acțiune, pentru a verifica dacă răspunsul este, eventual, suprimat de către substanțele interferente prezente în extractul de probă. Concentrația măsurată a probei îmbogățite se compară cu suma concentrației extractului neîmbogățit, plus concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este cu peste 25 % mai mică decât concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă este

supusă analizei de confirmare prin GC-HRMS. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității.

5.7.5. Controlul calității probelor conforme:

Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, sunt confirmate prin GC-HRMS.

5.7.6. Determinarea ratelor rezultatelor fals conforme pornind de la datele de control al calității:

Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele rezultatelor fals conforme reale trebuie să fie sub 5 %. Atunci când, în urma controlului de calitate al probelor conforme, sunt disponibile cel puțin 20 de rezultate confirmate per matrice/grup de matrice, concluziile privind rata rezultatelor fals conforme trebuie să fie desprinse din această bază de date. Rezultatele probelor analizate prin intermediul testărilor interlaboratoare sau în timpul incidentelor de contaminare, care acoperă un interval de concentrații de până la, de exemplu, $2 \times$ nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei rezultatelor fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.

Deși testele de screening au, preferabil, ca scop detectarea probelor care depășesc pragul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor rezultatelor fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare.

5.7.7. Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului se verifică întotdeauna printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă analitică de confirmare. Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor fals neconforme. Pentru metodele de screening, rata rezultatelor fals neconforme este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat în legătură cu proba că este potențial neconformă. Evaluarea avantajelor metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă.

5.7.8. În condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ.

Și pentru metodele bioanalitice efectuate în condiții de repetabilitate, valoarea RSD_r intralaborator ar fi, în general, mai mică decât în condiții de reproductibilitate (RSD_R)

6. Cerințe specifice privind metodele GC-MS care trebuie respectate în scop de screening sau de confirmare

6.1. *Diferențe acceptabile între estimarea superioară și estimarea inferioară a rezultatelor OMS-TEQ*

Diferența dintre nivelul estimării superioare și cel al estimării inferioare nu depășește 20 % pentru confirmarea depășirii nivelului maxim sau în cazul în care sunt necesare praguri de acțiune.

6.2. *Controlul recuperărilor*

6.2.1. La începutul metodei de analiză, de exemplu, înaintea fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ^{13}C și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C , pentru a se valida procedura analitică. Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra- până la octo-clorurate de PCDD/F-uri și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB-uri de tipul dioxinelor (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă utilizat pentru monitorizarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, trebuie utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8, marcate cu ^{13}C și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C .

6.2.2. De asemenea, se determină factorii de răspuns relativ pentru acei congeneri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ^{13}C , utilizându-se soluții de calibrare corespunzătoare.

6.2.3. Pentru furajele de origine vegetală și furajele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru furajele de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înaintea extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne.

6.2.4. Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).

6.2.5. Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele p-dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening prin GC-MS, recuperările trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.

6.3. *Eliminarea substanțelor interferente*

— Separarea PCDD/PCDF-urilor de compuși clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și bifenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumina și/sau cărbune).

— Separarea izomerilor prin cromatografie în fază gazoasă este < 25 % de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Calibrarea cu curba standard*

Intervalul curbei de calibrare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau praguri de acțiune.

6.5. *Criterii specifice pentru metodele de confirmare*

— Pentru GC-HRMS:

În HRMS, rezoluția caracteristică trebuie să fie mai mare sau egală cu 10 000 pentru întregul interval al maselor, cu o concavitate de 10 %.

Îndeplinirea criteriilor de identificare și confirmare suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS).

— Pentru GC-MS/MS:

Monitorizarea a cel puțin doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs, pentru toți analiții etichetați și neetichetați din domeniul de aplicare al analizei.

Toleranța maximă admisă a intensităților relative ale ionilor de $\pm 15 \%$ pentru ionii de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (medie din standardele de calibrare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia de coliziune și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit.

Rezoluția fiecărui cuadropol trebuie să fie stabilită ca fiind egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: rezoluție suficientă pentru a separa două vârfuri ale unei unități de masă) în scopul de a reduce la minimum interferențele posibile cu analiții de interes.

Îndeplinirea criteriilor suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS), cu excepția obligației de a utiliza GC-HRMS.

7. Cerințe specifice pentru metodele bioanalitice

Metodele bioanalitice sunt metode bazate pe utilizarea de principii biologice precum testele pe bază de celule sau de receptori sau imunodozări. Prezentul punct stabilește cerințe pentru metodele bioanalitice în general.

O metodă de screening, în principiu, clasifică o probă ca fiind conformă sau suspectată a fi neconformă. În acest scop, nivelul BEQ calculat este comparat cu valoarea-limită (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând o analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ echivalent cu două treimi din nivelul maxim poate servi drept valoare-limită, cu condiția să se asigure o rată a rezultatelor fals conforme de sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori-limită corespunzătoare ale biotestelor pentru PCDD-uri/PCDF-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al pragului de acțiune respectiv este considerat adecvat ca valoare-limită.

Dacă un nivel indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele probelor trebuie să fie în intervalul de lucru și să depășească limita de raportare (a se vedea punctele 7.1.1 și 7.1.6).

7.1. Evaluarea răspunsului la test

7.1.1. Condiții generale

— Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de calibrare a TCDD, valorile la extremitățile superioare ale curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care acest CV este mai mic de 15 %. Extremitatea inferioară a intervalului de lucru (limita de raportare) se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii. Extremitatea superioară a intervalului de lucru este, de obicei, reprezentată de valoarea EC₇₀ (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru se stabilește în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 7.3) se situează în intervalul de lucru.

— Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate în triplicat sau cel puțin în duplicat. Atunci când se utilizează duplicate, o soluție etalon sau un extract de control testată (testat) în patru până la șase godeuri repartizate pe placă trebuie să producă un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %.

7.1.2. Calibrarea

7.1.2.1. Calibrarea cu curba standard

— Nivelurile din probe se estimează prin compararea răspunsului la test cu o curbă de calibrare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/PCDF/PCB de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă.

— Curbele de calibrare conțin între opt și 12 concentrații (cel puțin în duplicate), cu concentrații suficiente în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Ca atare, valoarea R² are valoare redusă sau nicio valoare în estimarea calității ajustării în regresia nelineară. Se ajunge la o ajustare mai bună prin reducerea la minimum a diferenței între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minimum a sumei pătratelor rezidualelor.

— Nivelul estimat din extractul de probă este corectat ulterior pentru nivelul BEQ calculat pentru o probă-martor de matrice/solvent (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al probelor de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 7.2.

7.1.2.2. Calibrarea cu eșantioane de referință

Alternativ, poate fi utilizată o curbă de calibrare realizată pe baza a cel puțin patru eșantioane de referință (a se vedea punctul 7.2.4): poate fi utilizată un eșantion martor de matrice, plus trei eșantioane de referință de 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim sau pragul de acțiune, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și de recuperare. În acest caz, răspunsul la test echivalent cu două treimi din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare-limită. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor praguri de acțiune este considerat adecvat ca valoare-limită.

7.1.3. Determinarea separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor

Extractele pot fi divizate în fracțiuni care conțin PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, permițând o indicare separată a nivelurilor TEQ pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de calibrare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor.

7.1.4. Recuperări aparente ale biotestului

„Recuperarea aparentă a biotestului” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF (⁴⁰) utilizați, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente reduse pentru PCB-urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD-uri/PCDF-uri. Prin urmare, în cazul în care se efectuează o determinare separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale testului

biologic sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 20 % și 60 %, pentru PCDD-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de calibrare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste intervale și se situează între 30 % și 130 %. Orice implicare a valorilor TEF revizuite în mod substanțial pentru legislația Uniunii pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor necesită revizuirea acestor intervale.

7.1.5. Controlul recuperărilor pentru curățare

Pierderea de compuși în timpul curățării se verifică în timpul validării. Un eșantion martor îmbogățit cu un amestec de congeneri diferiți face obiectul curățării ($n = 3$ cel puțin), iar recuperarea și variabilitatea sunt verificate printr-o metodă de confirmare. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congeneri care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri.

7.1.6. Limita de raportare

Atunci când se raportează nivelurile BEQ, se determină o limită de raportare pornind de la probele de matrice relevante care implică modele tipice pentru congeneri, dar nu pornind de la curba de calibrare a standardelor, din cauza preciziei reduse în intervalul inferior al curbei. Se iau în considerare efectele extracției și ale curățării. Limita de raportare se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii.

7.2. *Utilizarea eșantioanelor de referință*

7.2.1. Eșantioanele de referință reprezintă matricea de eșantionare, modelele pentru congeneri și intervalele de concentrație pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune.

7.2.2. În fiecare serie de teste, se includ o matrice martor și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, un eșantion martor din cadrul procedurii, precum și un eșantion de referință la nivelul maxim sau la pragul de acțiune. Aceste eșantioane se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Eșantionul de referință prezintă un răspuns cu mult mai mare în comparație cu eșantionul martor, asigurând astfel conformitatea testului. Aceste eșantioane pot fi utilizate pentru corecțiile în funcție de martor și recuperare.

7.2.3. Probele de referință alese pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare sunt reprezentative pentru probele de testare, în sensul că modelele pentru congeneri nu pot conduce la o subestimare a nivelurilor.

7.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de $0,5 \times$ și $2 \times$ nivelul maxim sau pragul de acțiune, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 7.1.2.2).

7.3. **Determinarea valorilor-limită**

Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele în urma metodei de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de calibrare în raport cu matricea, care implică probe de referință îmbogățite la 0, 0,5x, 1x și 2x față de nivelul maxim (NM), cu șase repetări la fiecare nivel ($n = 24$)]. Factorii de corecție (martor și recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, însă se verifică în conformitate cu punctul 7.2.2.

Valorile-limită se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul pragurilor de acțiune, în cazul în care acest lucru este relevant, cu nivelurile maxime sau pragul de acțiune respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Acestea sunt reprezentate prin extremitatea inferioară a distribuției rezultatelor bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) care corespund limitei de decizie a metodei de confirmare bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată a rezultatelor fals conforme $< 5 \%$, și pe o valoare a $RSD_R < 25 \%$. Limita de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 7.3.1, 7.3.2 și 7.3.3 (a se vedea figura 1).

7.3.1. Utilizarea sectorului *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare

$$\text{Valoarea limită} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \cdot t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \bar{x})^2 / Q_x}$$

unde:

BEQ_{DL} BEQ corespunzând limitei de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă

$s_{y,x}$ deviația standard reziduală

$t_{\alpha, f = m-2}$ factorul student ($\alpha = 5 \%$, $f =$ grade de libertate, asimetric)

m numărul total de puncte de calibrare (indice j)

n numărul de repetări la fiecare nivel

x_i concentrația probei (în TEQ) a punctului de calibrare i determinat printr-o metodă de confirmare

$\bar{x}$ medie a concentrațiilor (în TEQ) ale tuturor probelor de calibrare

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \quad \begin{array}{l} \text{parametrul sumei pătratelor, } i = \text{indice pentru punctul} \\ \text{de calibrare } i \end{array}$$

7.3.2. Calcul pornind de la rezultatele bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) ale analizelor multiple ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

$$\text{Valoarea limită} = BEQ_{DL} - 1,64 SD_R \quad \text{unde:}$$

SD_R deviația standard a rezultatelor biotestului la BEQ_{DL} , măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

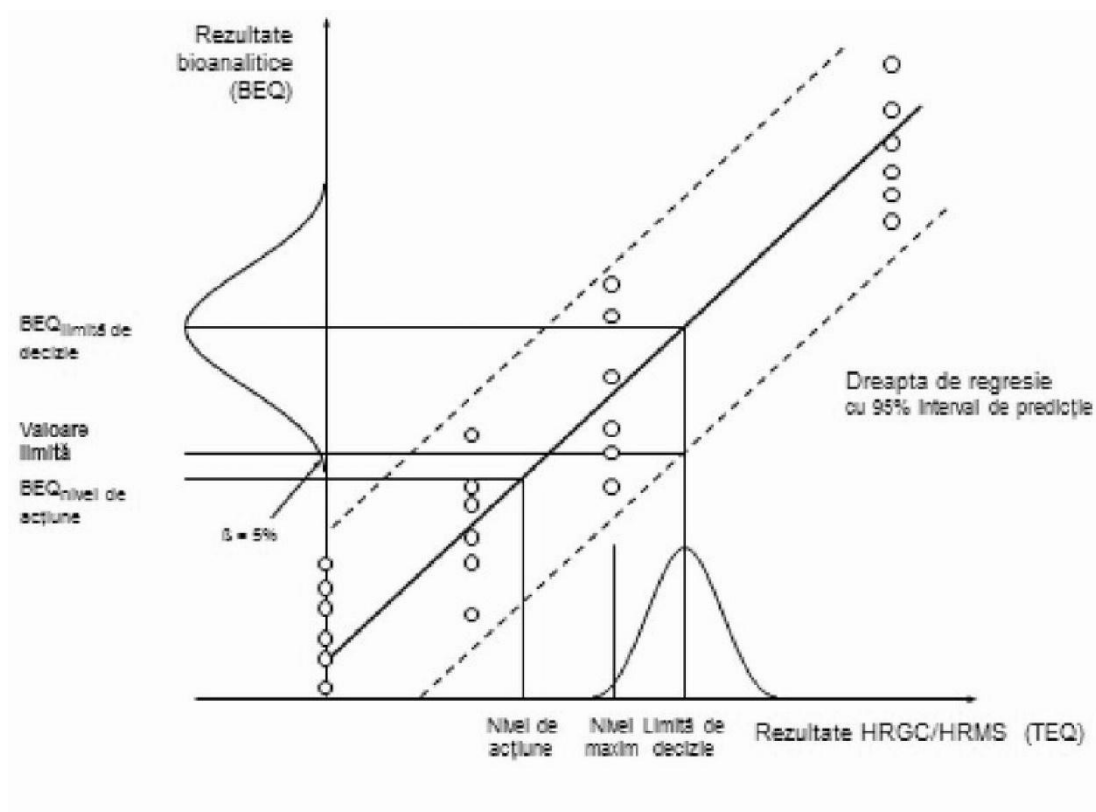
7.3.3. Calcul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectată în funcție de martor și recuperare) pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinate la punctul 7.3.1 sau la punctul 7.3.2:

Calcul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme $< 5 \%$, și pe o valoare a $RSD_R < 25 \%$:

1. pornind de la spectrul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie a metodei de confirmare.

2. pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor (reprezentată în Figură 1 printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

Figura 1



7.3.4. Restricții ale valorilor-limită

Valorile-limită bazate pe BEQ, calculate pornind de la valoarea RSD_R obținută în cursul validării utilizând un număr limitat de probe cu modele pentru matrice/congeneri diferite pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau pragurile de acțiune bazate pe TEQ datorită unei precizii mai mari decât cea realizabilă în analizele de rutină atunci când trebuie controlat un spectru necunoscut de posibile modele pentru congeneri. În astfel de cazuri, valorile-limită se calculează pornind de la $RSD_R = 25\%$ sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune.

7.4. Caracteristici de performanță

7.4.1. Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, testele cu privire la repetabilitatea metodelor bioanalitice se efectuează

pentru obținerea unor informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste și între serii de teste. Repetabilitatea trebuie să fie sub 20 %, iar reproductibilitatea intralaborator sub 25 %. Aceasta se bazează pe nivelurile calculate în BEQ după corecția în funcție de martor și recuperare.

7.4.2. Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită stabilirea diferenței între o probă-martor și un nivel la valoarea-limită, permițând identificarea probelor peste valoarea-limită corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2).

7.4.3. Se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului.

7.4.4. Deviația standard procentuală a răspunsului sau a concentrației calculate pornind de la răspuns (posibilă numai în intervalul de lucru) a unei determinări triple a unui extract de probă nu poate fi mai mare de 15 %.

7.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimate (exprimate) în BEQ (martor și nivelul maxim sau pragul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.

7.4.6. Graficele de control al calității pentru martorii procedurii și fiecare tip de probă de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că performanța analitică este în conformitate cu cerințele, în special pentru martorii procedurii cu privire la diferența minimă solicitată la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Martorii procedurii sunt controlați într-un mod care să evite rezultatele fals conforme atunci când se scad.

7.4.7. Rezultatele metodelor de confirmare ale probelor suspectate și a 2-10 % din probele conforme (minimum 20 de probe pentru fiecare matrice) sunt colectate și folosite pentru a evalua performanța metodei de screening și relația între BEQ și TEQ. Această bază de date poate fi utilizată pentru reevaluarea valorilor-limită aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate.

7.4.8. Buna performanță a metodelor poate fi, de asemenea, demonstrată prin participarea la testările interlaboratoare. Rezultatele probelor analizate în testările interlaboratoare, care acoperă un interval de concentrații care să ajungă până la, de exemplu, 2x nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei rezultatelor fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.

7.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident.

8. Raportarea rezultatelor

8.1. *Metode de confirmare*

8.1.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și sunt raportate ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințe specifice.

8.1.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.

8.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, se utilizează suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.1.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

8.2. *Metode bioanalitice de screening*

8.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).

8.2.2. În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu în TEQ.

8.2.3. Probele cu un răspuns inferior limitei de raportare se exprimă ca fiind „sub limita de raportare”. Rezultatul probelor cu un răspuns peste intervalul de lucru se raportează ca „depășind intervalul de lucru”, iar nivelul corespunzător extremității superioare a intervalului de lucru se furnizează în BEQ.

8.2.4. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

8.2.5. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de calibrare.

8.2.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.2.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.

8.2.8. Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare.

8.3. *Metode fizico-chimice de screening*

8.3.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).

8.3.2. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

8.3.3. În plus, nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și/sau ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ se pot furniza ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

8.3.4. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.

8.3.5. Raportul trebuie să menționeze metoda GC-MS utilizată.

8.3.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.3.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.

8.3.8. Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare.

Capitolul nr. 3

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. Domeniu de aplicare

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de bifenili policlorurați care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor), precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

2. Metode de detectare aplicabile

Gaz-cromatografie/detectare prin captură de electroni (GC-CDE), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS sau metode echivalente.

3. Identificarea și confirmarea analiților de interes

3.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă +/- 0,25 %).

3.2. Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri co-eluate, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să se confirme.

3.3. Cerințe pentru tehnici GC-MS

Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:

- (a) doi ioni specifici pentru HRMS;
- (b) trei ioni specifici pentru LRMS;
- (c) doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs pentru MS-MS.

Toleranțele maxime admisibile pentru raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate:

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a abundenței izotopice sau standardul de calibrare pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) calificativ(i): $\pm 15 \%$.

3.4. Cerințe pentru tehnici GC-ECD

Rezultatele care depășesc nivelul maxim sunt confirmate cu două coloane de GC cu faze staționare de polaritate diferită.

4. Demonstrarea randamentului metodei

Randamentul metodei se validează în intervalul nivelului maxim (0,5 la 2 x nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 9).

5. Limita de cuantificare

Suma limitelor de cuantificare (LOQ) ale PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim.

6. Controlul calității

Controale ale matorului, analiză a probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante, la intervale regulate.

7. Controlul recuperărilor

7.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.

7.2. Adăugarea de etaloane interne:

adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare).

7.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop:

- (a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne;
- (b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;
- (c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10 % sunt acceptabile.

7.4. Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:

- (a) recuperarea etalonului (etalonelor) intern(e) se controlează pentru fiecare probă;
- (b) recuperările etalonului (etalonelor) intern(e) sunt între 60 % și 120 %;
- (c) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne.

7.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 60 și 120 %.

8. Cerințe pentru laboratoare

În conformitate cu dispozițiile Legii 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul SM ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului SM EN ISO/IEC 17025:2018. În plus, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCB-urilor.

9. Caracteristici de performanță: criterii pentru suma celor șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor la nivelul maxim

	Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor ^(*)	Alte tehnici
Autenticitate	între -20 % și 20 %	între -30 % și 30 %
Precizie intermediară (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %
(*) Utilizarea tuturor celor șase analogi marcați ¹³ C, conform standardelor interne.		

10. Raportarea rezultatelor

10.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor individuali care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor congeneri raportați ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.

10.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor.

10.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.

10.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus și el la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.

10.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

B. STANDARDE SM EN

Pentru aplicarea art. 32 alin.(2) lit. a) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, sunt relevante următoarele standarde SM EN:

SM EN 17194:2020: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea deoxinivalenolului, aflatoxinei B1, fumonisinei B1 și B2, T-2 și H-2, a zearalenonei și ochratoxinei A în materiile prime furajere și în furajele combinate prin LC-MS/MS

SM EN 17270:2020: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea teobrominei din materiile prime furajere și din furajele combinate, inclusiv ingredientele derivate din cacao, prin cromatografie lichidă

SM EN 17504:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză. Determinarea gosipolului din semințele de bumbac și furaje prin LC-MS/MS

SM EN 17362:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea pentaclorfenolului (PCP) în materiile prime furajere și în furajele combinate prin LCMS/MS

SM EN 16279:2017: Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de fluorură după tratamentul cu acid clorhidric prin metoda electrozilor sensibili la ioni (ISE)

SM EN 17053:2018: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă)

SM EN 15550:2018 Hrană pentru animale – Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea cadmiului și a plumbului prin spectrometrie de absorbție atomică în cuptorul cu grafit (GF-AAS) după dizolvare sub presiune

SM EN 16206:2017 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen)

SM EN 16277:2017 Hrană pentru animale – Determinarea mercurului prin spectrometrie de absorbție atomică cu vapori reci (CVAAS) după dizolvarea cu microunde (extracție cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen)

SM EN 16278:2017 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului anorganic prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (HG-AAS) după extracție cu microunde și separarea prin extracție în fază solidă (SPE)

SM EN 17374:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea arsenului anorganic din furaje prin HPLC-ICP-MS cu schimbător de anioni.

Anexă nr.6
la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA CONSTITUENŢILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL FURAJELOR

1. SCOP ŞI DOMENIU DE APLICARE

Determinarea constituenţilor de origine animală în hrana pentru animale se efectuează prin microscopie optică sau reacţie în lanţ a polimerazei (PCR), în conformitate cu dispoziţiile stabilite în prezenta anexă.

Aceste două metode fac posibilă depistarea prezenţei constituenţilor de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor şi în hrana combinată pentru animale. Totuşi, ele nu fac posibilă calcularea cantităţii acestor constituenţi în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor şi în hrana combinată pentru animale. Ambele metode au o limită de detecţie sub 0,1 % (G/G).

Metoda PCR face posibilă identificarea grupului taxonomic al constituenţilor de origine animală prezenţi în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor şi în hrana combinată pentru animale.

Aceste metode se aplică pentru controlul aplicării interdicţiilor prevăzute la pct.31 din Normei privind stabilirea unor măsuri pentru prevenirea, controlul şi eradicarea anumitor forme transmisibile de encefalopatie spongiformă conform Hotărârii Guvernului nr. 713/2024 şi în anexa nr.3 la hotărârea respectivă şi la art. 11 alin. (1) la Legea nr. 129/2019 privind subprodusele de origine animală şi produsele derivate care nu sunt destinate consumului uman .

În funcţie de tipul de hrană pentru animale testată, aceste metode pot fi utilizate, în cadrul unui singur protocol operaţional, fie singure, fie combinate, în conformitate cu procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de

referință pentru depistarea proteinelor animale în hrana pentru animale (EURL-AP) și publicate pe site-ul său de internet ([47](#)).

2. METODE

2.1. Microscopie optică

2.1.1. Principiu

Constituenții de origine animală care pot fi prezenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, trimise spre analizare, sunt identificați pe baza caracteristicilor tipice și identificabile microscopic, cum ar fi fibrele musculare și alte particule de carne, cartilajul, oasele, coarnele, părul, părul, părul de porc, fragmentele cuticulare ale nevertebratelor, structurile traheale ale insectelor, produsele de sânge, globule din lapte, cristalele de lactoză, penele, cojile de ouă, oasele și solzii de pește.

Examinările microscopice se efectuează după prepararea eșantioanelor prin sedimentare.

Eșantioanele se supun unei etape de sedimentare, după cum urmează:

(a) pentru depistarea constituenților de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, o singură etapă de sedimentare cu tetracloretilenă (TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.3;

(b) pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, o etapă dublă de sedimentare cu eter de petrol/tetracloretilenă (PE/TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.4.

2.1.2. Reactivi și echipamente

2.1.2.1. Reactivi

2.1.2.1.1. Agent de concentrare

— Tetracloretilenă (greutate specifică 1,62).

— Eter de petrol (PE) punct de fierbere 40-60 °C (greutate specifică 0,65).

2.1.2.1.2. Agent de colorare

— Soluție de roșu de alizarină (se diluează 2,5 ml acid clorhidric 1M în 100 ml apă și se adaugă 200 mg roșu de alizarină în soluția obținută).

2.1.2.1.3. Medii de montare

- Leșie (NaOH 2,5 % G/V sau KOH 2,5 % G/V).
- Glicerol (nediluat, vâscozitate: 1 490 cP) sau un mediu de montare cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente.
- Adeziv Norland ® Optical 65 (vâscozitate: 1 200 cP) sau o rășină cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente.

2.1.2.1.4. **Mediu de montare cu proprietăți de colorare**—

Soluție Lugol (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent).

- Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml apă).
- Reactiv Fehling [preparat înainte de utilizare din părți egale (1/1) de soluții bistoc A și B: soluția A [se dizolvă 6,9 g de sulfat de cupru (II) pentahidrat în 100 ml apă]; soluția B (se dizolvă 34,6 g de tartrat de potasiu și sodiu tetrahidrat și 12 g NaOH în 100 ml apă).
- Tetrametilbenzidină/peroxid de hidrogen [se dizolvă 1 g de 3,3', 5,5' tetrametilbenzidină (TMB) în 100 ml acid acetic glacial și 150 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă patru părți din această soluție TMB cu o parte de soluție de peroxid de hidrogen 3 %].

2.1.2.1.5. **Agenți de limpezire**

- Etanol ≥ 96 % (puritate tehnică).
- Acetonă (puritate tehnică).

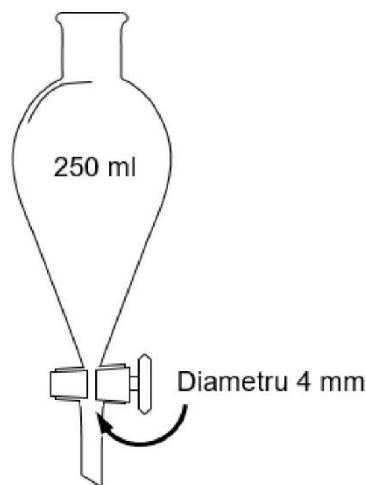
2.1.2.1.6. **Agent de decolorare**

- Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9-14 % clor activ).

2.1.2.2. **„Echipamente**

- Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g.
- Echipament de măcinare: moară cu cuțite sau cu rotor. Dacă este utilizată o moară cu rotor, sitele $\leq 0,5$ mm sunt interzise.
- Sitele cu ochiuri pătrate de 0,25 mm și 1 mm lățime. Cu excepția cernerii în prealabil a eșantioanelor, diametrul sitelor trebuie să nu depășească 10 cm pentru a evita pierderea de materiale. Nu este necesară calibrarea sitelor.

— Pâlnie de separare conică din sticlă cu un conținut de 250 ml cu robinet din teflon sau din sticlă șlefuită la baza conului. Diametrul de deschidere al robinetului trebuie să fie ≥ 4 mm. De asemenea, pentru etapa de sedimentare doar cu TCE, se poate folosi un pahar de sedimentare conic, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat că nivelurile de detecție sunt echivalente cu cele obținute utilizând pâlnia de separare conică din sticlă.



Pâlnie de separare

— Microscop stereoscopic care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 6,5 x-40 x.

— Microscop compus care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 100 x-400 x, cu câmp luminos cu lumină transmisă. Se pot utiliza, în plus, lumină polarizată, contrast interferențial diferențial.

— Sticlărie de laborator standard.

—Echipamente pentru prepararea lamelor: lame de microscop clasice, lame tubulare, lamele (20 × 20 mm), pensete, spatulă fină.

— Cuptor de laborator.

— Centrifugă.

— Filtru de hârtie: filtru din celuloză de calitate (dimensiunea porilor 4-11 μ m).

2.1.3. *Eșantionarea și prepararea eșantioanelor*

2.1.3.1. **Eșantionare**

Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu anexa nr. 1.

2.1.3.1.1. **Uscarea eșantioanelor**

Eșantioanele cu un conținut de umiditate $> 14 \%$ se usucă înainte de manipulare în conformitate cu anexa nr. 3.

2.1.3.1.2. Cernerea în prealabil a eșantioanelor

Pentru a colecta informații privind posibila contaminare ambientală a hranei destinate animalelor, se recomandă să se cearnă în prealabil la dimensiunea de 1 mm hrana sub formă de pelete și grăunțe și apoi să se prepare, să se analizeze și să se raporteze separat cele două fracțiuni rezultate, care trebuie să fie considerate ca eșantioane distincte.

2.1.3.2. Măsuri de precauție

Pentru a se evita contaminarea încrucișată în laborator, toate echipamentele reutilizabile se curăță cu grijă înainte de utilizare. Piesele pâlniei de separare se demontează înainte de curățare. Piesele pâlniei de separare și sticlăria se prespală manual și apoi se spală într-o mașină de spălat. Sitele se curăță utilizând o perie cu peri sintetici aspri. Se recomandă curățarea finală a sitelor cu acetonă și aer comprimat după cernerea materiilor grase, precum făina de pește.

2.1.3.3. Prepararea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri

Pentru prepararea eșantioanelor constând în grăsimi se aplică următorul protocol:

- Dacă grăsimea este solidă, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă.
- Cu ajutorul unei pipete, 40 ml de grăsime se transferă din partea inferioară a eșantionului într-un tub de centrifugă.
- Eșantionul se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 r.p.m.
- Dacă grăsimea este solidă după centrifugare, se încălzește într-un cuptor până când devine lichidă.
- Centrifugarea se repetă timp de 5 minute la 4 000 r.p.m.
- Cu ajutorul unei lingurițe sau al unei spatule, jumătate din impuritățile decantate se transferă spre examinare pe lame de microscopie. Ca mediu de montare se recomandă glicerolul.
- Impuritățile rămase se utilizează pentru prepararea sedimentului astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, prima liniuță.

Același protocol, cu excepția primei și a celei de a patra liniuțe, se aplică pentru prepararea eșantioanelor de ulei.

2.1.3.4. Prepararea altor eșantioane decât de grăsimi sau uleiuri

2.1.3.4.1. Subeșantionare și măcinare: cel puțin 50 g din eșantion se subeșantionează pentru analizare și ulterior se macină.

2.1.3.4.2. Prepararea materiei prime: se prepară o porțiune de cel puțin 5 g de subeșantion măcinat. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.

2.1.3.4.3. Sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea constituenților de origine animală, alta decât nevertebratele terestre.

— Extragerea și prepararea sedimentului:

O porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare sau în paharul de sedimentare conic și se adaugă 50 ml de TCE. Porțiunea transferată în pâlnie se limitează la 3 g în cazul făinii de pește sau al altor produse de origine pur animală, al ingredientelor minerale sau al preamestecurilor care generează sedimente în proporție de peste 10 %. Amestecul se agită energic cel puțin 30 de secunde și se mai adaugă cu atenție 50 ml de TCE în timp ce se spală suprafața interioară a pâlniei pentru a îndepărta orice urmă de particule aderente. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute înainte de a separa sedimentul prin deschiderea robinetului.

Dacă se utilizează un pahar de sedimentare conic, se agită energic amestecul timp de cel puțin 15 secunde, iar particulele care aderă la pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul se lasă să stea 3 minute și apoi se agită din nou timp de 15 secunde, iar particulele care aderă pe pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute, iar apoi fracțiunea lichidă se înlătură și se elimină prin decantare atentă, având grijă să nu se piardă nimic din sediment.

Sedimentul se colectează într-un filtru de hârtie plasat într-o pâlnie pentru a permite separarea restului de TCE, evitându-se în același timp depunerile de grăsime în sediment. Sedimentul se usucă. Se recomandă cântărirea ulterioară a sedimentului (cu o precizie de 0,001 g) pentru a controla etapa de sedimentare. La final, sedimentul

se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară.

— Extragerea și prepararea materiei flotante:

După recuperarea sedimentului prin metoda descrisă mai sus, rămân două faze în pâlnia de separare: una lichidă constând în TCE și una solidă alcătuită din materie flotantă. Această fază solidă este materia flotantă și se recuperează vărsând afară toată TCE din pâlnie prin deschiderea robinetului. Prin răsturnarea pâlniei de separare, materia flotantă este transferată într-o placă Petri mare și uscat cu aer într-o hotă de tiraj. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate.

— Utilizarea agenților de colorare:

Pentru a facilita identificarea corectă a constituenților de origine animală, operatorul poate utiliza agenți de colorare în timpul preparării eșantioanelor, în conformitate cu orientările emise de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet.

În cazul în care se utilizează soluție de roșu de alizarină pentru colorarea sedimentului, se aplică următorul protocol:

— Sedimentul uscat se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și 30 de secunde și se elimină prin vărsare).

— Sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu. Se permite ca reacția să continue timp de 10 minute. Eprubeta se umple cu apă, sedimentul se lasă să se decanteze timp de 2-3 minute, iar apa și particulele în suspensie se elimină cu grijă prin vărsare.

— Sedimentul se mai clătește de două ori cu aproximativ 10 ml de apă (se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, se lasă să se decanteze și se varsă apa de fiecare dată).

— Se adaugă între 2 și 10 picături de soluție de roșu de alizarină, iar amestecul se agită. Se permite desfășurarea reacției timp de 30 de secunde, iar sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol, apoi o dată cu acetonă (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și se varsă afară).

— Sedimentul colorat se usucă.

2.1.3.4.4. Sedimentarea dublă PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate.

Toate etapele se realizează într-o pâlnie de separare conică din sticlă de 250 ml, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.2, a patra liniuță.

— O porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare și se supune mai întâi unei singure sedimentări cu TCE, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, inclusiv recuperării sedimentului pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Acest sediment poate fi utilizat ca cel obținut la punctul 2.1.3.4.3.

— Volumul mic de TCE drenat împreună cu sedimentul se transferă într-un cilindru gradat. Prin deschiderea robinetului pâlniei de separare, cilindrul gradat trebuie umplut suplimentar până la obținerea a 30 ml de TCE. După atingerea acestui volum, robinetul se închide.

— Acest volum colectat de TCE se înlocuiește prin adăugarea unui volum de 30 ml de eter de petrol cu punct de fierbere 40-60 °C în pâlnia de separare. Conținutul pâlniei de separare se amestecă minuțios pentru a obține un amestec 30 % PE/70 % TCE (cu o densitate de aproximativ 1,26 g x cm⁻³). Se lasă materialul să se decanteze timp de 10 minute. Două fracțiuni noi se vor separa: un al doilea sediment și o materie flotantă finală (< 1,26 g x cm⁻³). Al doilea sediment se recuperează într-o placă Petri (sau cu o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie) prin deschiderea robinetului până când în pâlnia de separare rămân doar puțin amestec de solvent și puțină materie flotantă finală. Lichidul rămas și materia flotantă finală se colectează separat pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Peretele pâlniei de separare se clătește cu un jet de PE pentru a colecta toate materialele din materia flotantă finală. Materia flotantă finală se lasă să se usuce. La final, materia flotantă finală se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate în vederea depistării constituenților proveniți de la animale nevertebrate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară.

2.1.4. *Examinare microscopică*

2.1.4.1. Prepararea lamelor

Lamele de microscopie se prepară din sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie din materia flotantă, fie din materia primă. Dacă este cazul, numai

pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se prepară lame și din materia flotantă finală obținută conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4. Se prepară cele două fracțiuni rezultate (cea fină și cea grosieră). Porțiunile de testat din fracțiuni întinse pe lame trebuie să fie reprezentative pentru întreaga fracțiune.

Se pregătește un număr suficient de lame pentru a se asigura că se poate efectua un protocol complet de examinare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.4.2.

Lamele de microscopie se montează cu mediul de montare adecvat în conformitate cu PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet. Lamele se acoperă cu lamele de acoperire.

2.1.4.2. Diagrama de observare pentru depistarea particulelor de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale.

Lamele de microscopie preparate se observă în conformitate cu diagramele de observare stabilite în diagramele 1 și 2.

Observațiile de microscopie se realizează utilizând microscopul compus pe sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie pe materia flotantă, fie pe materia primă. În plus, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se efectuează observații și asupra materiei flotante finale obținute conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4, în conformitate cu diagrama 3. Microscopul stereoscopic poate fi utilizat în plus față de microscopul compus pentru fracțiunile grosiere. Fiecare lamă se examinează în întregime la diferite amplificări. Explicații precise cu privire la modul de utilizare a diagramelor sunt detaliate printr-o PSO stabilită de EURL-AP și publicată pe site-ul său de internet.

Numărul minim de lame care trebuie observate în fiecare etapă a diagramelor de observare trebuie să fie strict respectat, cu excepția cazului în care întregul material al fracțiunii nu permite să se ajungă la numărul prevăzut de lame, de exemplu atunci când nu se obține deloc sediment. Nu se utilizează mai mult de 6 lame pentru fiecare determinare pentru înregistrarea numărului de particule.

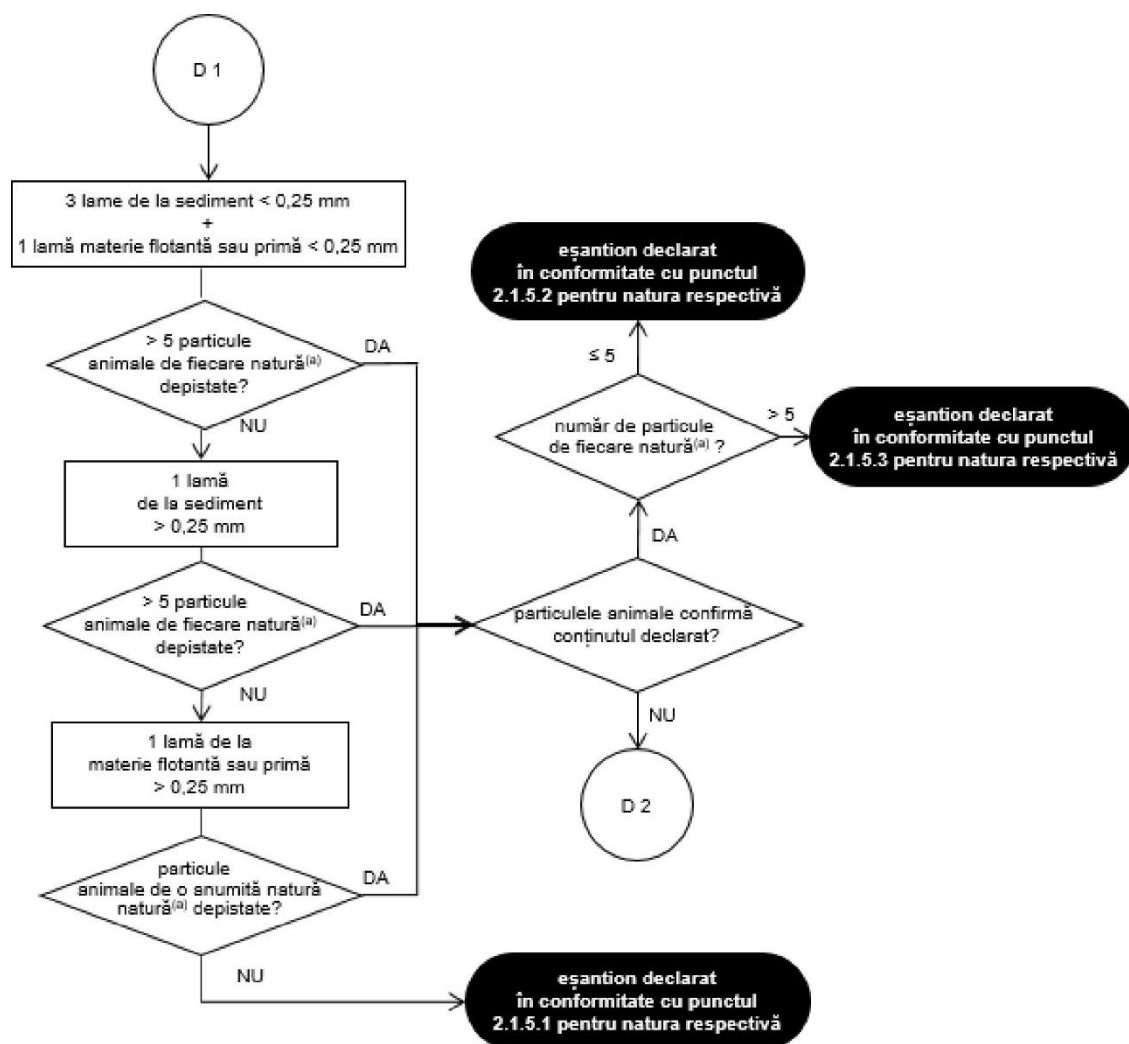
În cazul în care se prepară lame suplimentare cu ajutorul unui mediu de montare mai specific, cu proprietăți de colorare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.4, pe materia flotantă sau pe materia primă pentru a caracteriza suplimentar structurile (de exemplu, pene, păr, mușchi sau particule de sânge), care au fost depistate pe lamele preparate cu alte medii de montare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.3, numărul de particule se numără pe baza unui număr de lame per

determinare care nu depășește 6, inclusiv lamele suplimentare cu un mediu de montare mai specific. Lamele suplimentare preparate din materia flotantă finală obținută, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.4, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre nu se iau în considerare pentru identificarea altor naturi (vertebrate terestre și pești).

Pentru a facilita identificarea naturii și originii particulelor, operatorul poate utiliza instrumente de sprijin cum ar fi sisteme de asistare în luarea deciziilor, biblioteci de imagini și eșantioane de referință.

Diagrama 1

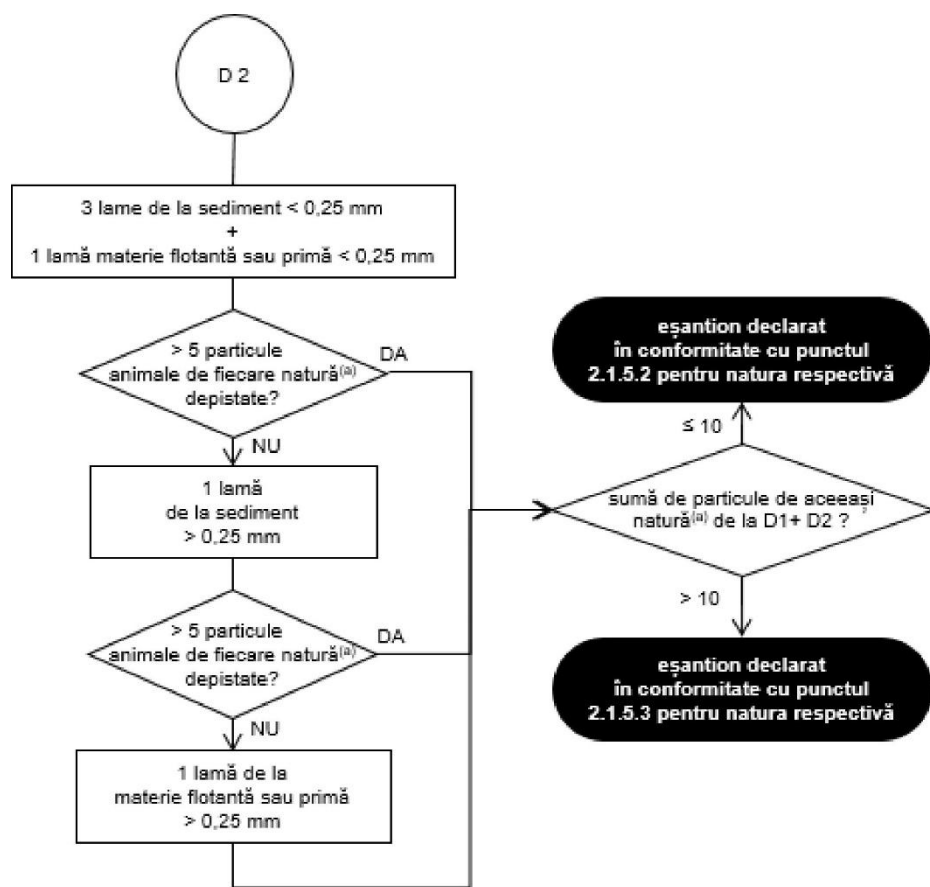
Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru prima determinare



(„D1” și „D2” se referă la prima și la a doua determinare; ^(a): vertebrate terestre, pește)

Diagrama 2

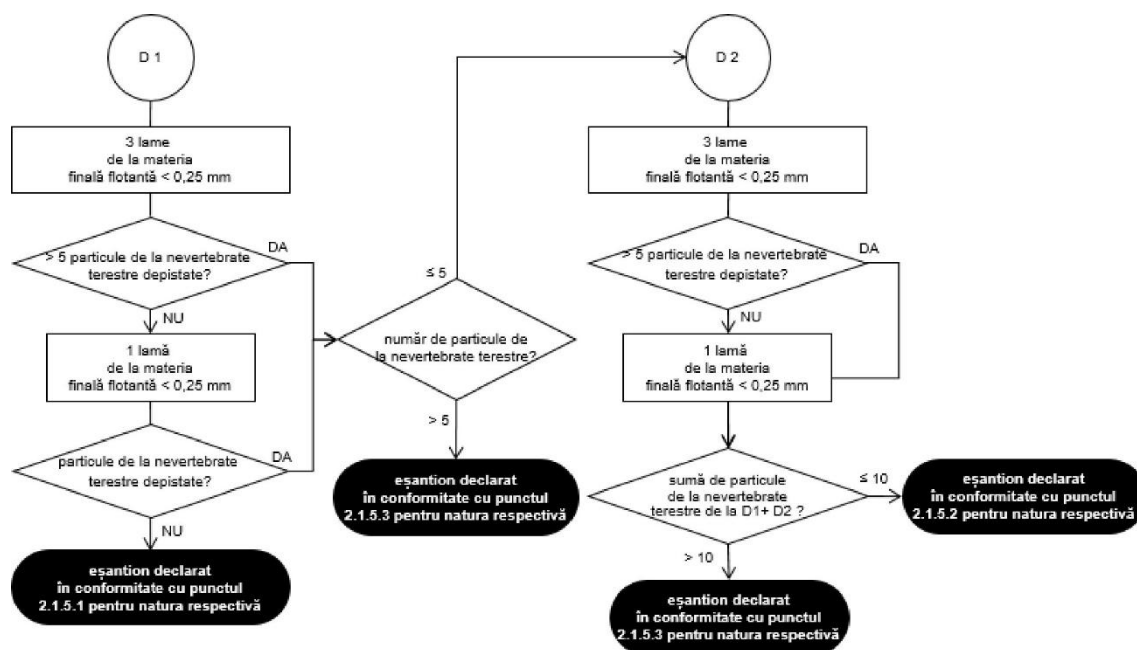
Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru a doua determinare



(„D1” și „D2” se referă la prima și la a doua determinare; ^(a): vertebrate terestre, pește)

Diagrama 3

Diagramă de observare după sedimentarea dublă cu PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale



(„D1” și „D2” se referă la prima și la a doua determinare; (a): vertebrate terestre, pește)

2.1.4.3. Numărul de determinări

Determinările se efectuează pe subeșantioane diferite de 50 g fiecare.

Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1 sau, după caz, din diagrama 3, nu se depistează deloc particule de origine animală, nu este necesară o determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.1.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1, se depistează una sau mai multe particule de origine animală de o anumită natură (și anume, vertebrate terestre sau pești), iar natura particulelor găsite confirmă conținutul declarat al eșantionului, nu este necesară o a doua determinare. Dacă numărul particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul acestei prime determinări este mai mare de 5, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3. Altminteri, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2.

Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 3 se depistează mai mult de 5 particule provenite de la nevertebrate terestre, nu este necesară o a doua determinare, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3 pentru această natură.

În toate celelalte cazuri, inclusiv atunci când nu a fost furnizată laboratorului nicio declarație cu privire la conținut, se efectuează o a doua determinare pornind de la un nou subeșantion. Dacă, în urma celei de-a doua determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 2 sau, după caz, din diagrama 3, suma particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul celor două determinări este mai mare de 10, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3. Altminteri, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2.

2.1.5. *Exprimarea rezultatelor*

Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică tipul de material care a fost analizat (sediment, materie flotantă, materie flotantă finală sau materie primă). Raportarea indică în mod clar numărul de determinări care au fost efectuate și dacă cernerea fracțiunilor înainte de prepararea lamelor, în conformitate cu punctul 2.1.3.4.3, prima liniuță, al treilea paragraf sau cu punctul 2.1.3.4.4, a treia liniuță, nu a fost efectuată.

Raportul laboratorului conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din vertebrate terestre și din pești.

Diferitele situații se raportează în modul următor:

2.1.5.1. Nu este depistată nicio particulă de origine animală de o anumită natură:

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la vertebrate terestre.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la pești.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la nevertebrate terestre.”

2.1.5.2. Între 1 și 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate în cazul în care a fost efectuată o singură determinare, sau între 1 și 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul efectuării a două determinări (numărul de particule depistate este sub limita de decizie stabilită în PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet):

În cazul în care s-a efectuat o singură determinare:

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

Atunci când au fost efectuate două determinări:

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la pești pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

În plus:

— În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

— Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule de origine animală au fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre.

2.1.5.3. Mai mult de 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate atunci când s-a efectuat o singură determinare sau mai mult de 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul a două determinări:

În cazul în care s-a efectuat o singură determinare:

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

— „În măsura în care a fost cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

Atunci când au fost efectuate două determinări:

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de

cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”

În plus:

— În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

— Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule de origine animală au fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre.

2.2. PCR

2.2.1. *Principiu*

Fragmentele de acid dezoxiribonucleic (ADN) de origine animală care pot fi prezente în materiile prime furajere și furajele combinate sunt detectate printr-o tehnică de amplificare genetică prin PCR, care vizează secvențe de ADN specifice speciei.

Metoda PCR necesită, în primul rând, o etapă de extragere a ADN-ului. Etapa de amplificare se aplică ulterior extractului de ADN astfel obținut, în vederea detectării speciilor de animale vizate de test.

2.2.2. *Reactivi și echipamente*

2.2.2.1. Reactivi

2.2.2.1.1. Reactivi pentru etapa de extragere a ADN-ului

Se utilizează numai reactivii aprobați de laboratorul de referință pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicați pe site-ul internet al acestuia.

2.2.2.1.2. Reactivi pentru etapa de amplificare genetică

2.2.2.1.2.1. Primeri și sonde

Se utilizează numai primerii și sondele cu secvențe de oligonucleotide validate de către laboratorul de referință pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale.

2.2.2.1.2.2. Amestecul principal

Se utilizează doar soluțiile de amestec principal care nu conțin reactivi susceptibili să conducă la rezultate false datorită prezenței de ADN animal.

2.2.2.1.2.3. Reactivi de decontaminare

2.2.2.1.2.3.1. Soluție de acid clorhidric (0,1N)

2.2.2.1.2.3.2. Înălbitor (soluție de hipoclorit de sodiu la 0,15 % din clor activ)

2.2.2.1.2.3.3. Reactivi necorozivi pentru decontaminarea dispozitivelor costisitoare, precum balanțele analitice (de exemplu, DNA Erase™ al MP Biomedicals)

2.2.2.2. Echipamente

2.2.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g

2.2.2.2.2. Echipament de măcinare

2.2.2.2.3. Thermocycler care permite PCR în timp real

2.2.2.2.4. Microcentrifugă pentru tuburi de microcentrifugare

2.2.2.2.5. Set de micropipete care permit introducerea cu pipeta de la 1 µl până la 1 000 µl

2.2.2.2.6. Material de plastic standard de biologie moleculară: tuburi de microcentrifugare, vârfuri de plastic filtrate pentru micropipete, plăci adecvate pentru thermocycler.

2.2.2.2.7. Congelatoare pentru depozitarea eșantioanelor și reactivilor

2.2.3. Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor

2.2.3.1. Eșantionare

Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa nr. 1.

2.2.3.2. Pregătirea eșantioanelor

Pregătirea eșantioanelor de laborator înainte de extragerea ADN-ului respectă cerințele prevăzute în anexa nr. 2. Cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate.

Pregătirea eşantioanelor se efectuează într-o încăpere diferită de cele dedicate extragerii ADN-ului și reacțiilor de amplificare genetică descrise în SM EN ISO 24276:2014.

Se pregătesc două porțiuni de testat de cel puțin 100 mg fiecare.

2.2.4. *Extragerea ADN-ului*

Extragerea ADN-ului se efectuează pe fiecare porțiune de testat pregătită utilizând PSO stabilite de laboratorul de referință pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.

Se pregătesc două controale de extragere pentru fiecare serie de extrageri descrise în SM EN ISO 24276:2014:

- un control martor de extragere;
- un control de extragere al ADN-ului pozitiv.

2.2.5. *Amplificarea genetică*

Amplificarea genetică se efectuează utilizând metodele validate pentru fiecare specie care necesită identificare. Aceste metode sunt prevăzute în PSO stabilite de laboratorul de referință pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Fiecare extract de ADN se analizează în cel puțin două diluții diferite în scopul de a evalua inhibarea.

Se pregătesc două controale de amplificare pentru fiecare specie țintă, astfel cum se descrie în SM EN ISO 24276:2014.

- se utilizează un control țintă al ADN-ului pozitiv pentru fiecare placă sau serie de teste PCR;
- se utilizează un control al reactivului de amplificare (denumit, de asemenea, control fără etalon) pentru fiecare placă sau serie de teste PCR.

2.2.6. *Interpretarea și exprimarea rezultatelor*

Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică cel puțin greutatea porțiunilor de testat utilizate, tehnica de extragere utilizată, numărul de determinări efectuate și limita de detecție a metodei.

Rezultatele nu sunt interpretate și raportate în cazul în care controlul de extragere al ADN-ului pozitiv și controalele țintă ale ADN-ului pozitiv nu oferă

rezultate pozitive pentru obiectivul care face obiectul testului, în timp ce controlul reactivului de amplificare este negativ.

În cazul în care rezultatele celor două porțiuni de testat nu sunt consecvente, se repetă cel puțin etapa de amplificare genetică. În cazul în care laboratorul suspectează că extractele de ADN pot fi cauza inconsecvenței, se efectuează o nouă extracție de ADN și o altă amplificare genetică înainte de interpretarea rezultatelor.

Exprimarea finală a rezultatelor se bazează pe integrarea și interpretarea rezultatelor celor două porțiuni de testat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia.

2.2.6.1. Rezultat negativ

Un rezultat negativ este raportat după cum urmează:

Niciun ADN de la X nu a fost detectat în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).

2.2.6.2. Rezultat pozitiv

Un rezultat pozitiv este raportat după cum urmează:

A fost detectat ADN de la X în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).

Anexă nr.7

la Hotărârea Guvernului nr.686/2012

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A FURAJELOR PENTRU PĂSĂRI DE CURTE

1. METODA DE CALCUL ȘI EXPRIMAREA VALORII ENERGETICE

Valoarea energetică a hranei combinate pentru păsările de curte se calculează aplicându-se formula de mai jos, pe baza procentajului anumitor compuși analitici ai furajelor pentru păsări de curte. Această valoare se exprimă în megajouli (MJ) de energie metabolizabilă (EM), corectată pentru azot, per kilogram de furaje combinate:

$$\text{MJ/kg de EM} = 0,1551 \times \% \text{ proteină brută} + 0,3431 \times \% \text{ grăsime brută} + 0,1669 \times \% \text{ amidon} + 0,1301 \times \% \text{ zaharuri totale (exprimate în zaharoză)}.$$

2. TOLERANȚE APLICABILE VALORILOR DECLARATE

În cazul în care la inspecția oficială se constată o diferență (valoare energetică mai mare sau mai mică a furajului) între rezultatul inspecției și valoarea energetică menționată, se admite o toleranță de 0,4 MJ/kg EM.

3. EXPRIMAREA REZULTATULUI

Rezultatul obținut prin aplicarea formulei menționate se exprimă cu o zecimală.

4. METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE ANALIZĂ

Prelevarea eșantionului din furajele combinate și determinarea conținutului de compuși analitici indicați în metoda de calcul trebuie să se efectueze în conformitate cu metodele Uniunii de eșantionare și de analiză pentru controlul oficial al hranei pentru animale.

Se aplică următoarele metode:

— pentru determinarea conținutului de grăsime brută: procedura B a metodei de determinare a uleiurilor și a grăsimilor brute, din anexa nr. 3 partea G;

— pentru determinarea conținutului de amidon: metoda polarimetrică, din anexa nr. 3 partea K.

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A MATERIILOR PRIME DESTINATE HRANEI ANIMALELOR ȘI A HRANEI COMBinate PENTRU PISICI ȘI CÂINI

Valoarea energetică a materiilor prime destinate hranei animalelor și a hranei combinate pentru pisici și câini se calculează în conformitate cu SM EN 16967:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – ecuații predictive pentru energia metabolizabilă în materiile prime destinate hranei animalelor și în hrana combinată pentru animale (hrană pentru animale de companie) pentru pisici și câini, inclusiv în alimentele dietetice.

3. Prezenta hotărâre intră în vigoare la expirarea termenului de o lună de la data publicării în Monitorul Oficial al Republicii Moldova.

PRIM-MINISTRU

Alexandru MUNTEANU

Contrasemnează:

Ministru agriculturii și
industriei alimentare

Ludmila CATLABUGA

NOTA DE FUNDAMENTARE

la proiectul de hotărâre privind modificarea Hotărârii de Guvern nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor.

1. Denumirea sau numele autorului și, după caz, a/al participanților la elaborarea proiectului actului normativ

Autoritatea administrației publice: Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare

Subdiviziunea: Direcția sănătatea și bunăstarea animalelor.

Persoana responsabilă și datele de contact: Rodica Fotescu

Tel. 022 204 531, e-mail: rodica.fotescu@maia.gov.md

2. Condițiile ce au impus elaborarea proiectului actului normativ

2.1. Temeiul legal sau, după caz, sursa proiectului actului normativ

Proiectul Hotărârii Guvernului vine întru executarea acțiunii 91 Capitolul 12 din Cluster 5 anexa A a Programului național de aderare a Republicii Moldova la Uniunea Europeană pentru anii 2025-2029, aprobat prin Hotărârea de Guvern nr.306/2025 și în temeiul prevederilor art. 36 din Legea 221-XVI din 19 octombrie 2007 privind activitatea sanitar-veterinară.

2.2. Descrierea situației actuale și a problemelor care impun intervenția, inclusiv a cadrului normativ aplicabil și a deficiențelor/lacunelor normative

Hotărârea Guvernului nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor transpune Regulamentul (CE) nr. 152/2009 privind metodele de prelevare de probe și metodele de analiză pentru controlul oficial al furajelor. De la aprobarea acesteia, Regulamentul european a fost **modificat de mai multe ori**, inclusiv în ceea ce privește:

- actualizarea metodelor fizico-chimice și microbiologice utilizate în controlul oficial;
- introducerea unor metode noi pentru determinarea componentelor specifice;
- modificarea procedurilor de prelevare a probelor;
- revizuirea anexelor tehnice pentru a reflecta evoluțiile științifice și tehnologice.

În prezent, anexele HG nr. 686/2012 nu mai corespund în totalitate metodelor europene actualizate, ceea ce poate duce la:

- aplicarea unor metode de analiză care nu mai sunt conforme cu standardele UE;
- dificultăți în recunoașterea reciprocă a rezultatelor de laborator în relația cu statele membre;
- utilizarea metodelor depășite în controlul oficial, cu potențial impact asupra calității evaluării furajelor;
- lipsa alinierii la cerințele europene în contextul procesului de preaderare.

Pentru a menține **coerența, compatibilitatea și uniformitatea** metodelor utilizate în controlul oficial, este necesară **actualizarea HG nr. 686/2012**, astfel încât aceasta să reflecte **versiunea consolidată a Regulamentului (CE) nr. 152/2009**, inclusiv ultimele modificări adoptate de Comisia Europeană.

Intervenția normativă nu introduce reguli noi, ci **actualizează conținutul tehnic al anexelor**, pentru a asigura aplicarea în Republica Moldova a aceluiași metode utilizate la nivelul Uniunii Europene.

3. Obiectivele urmărite și soluțiile propuse

3.1. Principalele prevederi ale proiectului și evidențierea elementelor noi

Proiectul de Hotărâre a Guvernului are ca scop **actualizarea** Hotărârii Guvernului nr. 686/2012, astfel încât aceasta să reflecte ultimele modificări aduse Regulamentului (CE) nr. 152/2009. Principalele prevederi ale proiectului sunt:

1. Actualizarea anexelor tehnice privind metodele de analiză și prelevare de probe

Proiectul înlocuiește anexele existente cu **versiunea actualizată a metodelor europene**, incluzând:

- metode fizico-chimice revizuite;
- metode microbiologice actualizate;
- proceduri noi sau modificate de prelevare a probelor;
- metode suplimentare pentru determinarea componentelor specifice din furaje.

2. Corelarea terminologiei și trimiterilor tehnice

Se actualizează terminologia, trimiterile interne și trimiterile la legislația europeană, astfel încât HG 686/2012 să fie pe deplin aliniată cu **versiunea consolidată a Regulamentului (CE) nr. 152/2009**.

3. Consolidarea uniformității metodelor utilizate în controlul oficial

Proiectul asigură ca toate metodele aplicate în Republica Moldova:

- să fie identice cu cele utilizate în statele membre ale UE;
- să corespundă celor mai noi standarde tehnice;
- să permită recunoașterea rezultatelor la nivel european.

4. Menținerea structurii generale a actului normativ

Proiectul nu modifică arhitectura generală a HG nr. 686/2012 și nu introduce noi obligații pentru operatori. Intervenția are caracter **strict tehnic**, limitat la actualizarea conținutului anexelor și a referințelor.

3.2. Opțiunile alternative analizate și motivele pentru care acestea nu au fost luate în considerare

În procesul de elaborare a proiectului au fost analizate două opțiuni alternative:

Opțiunea 1 – Menținerea HG nr. 686/2012 în forma actuală

Această opțiune a fost respinsă, deoarece metodele de analiză și procedurile de prelevare prevăzute în actul existent nu mai corespund versiunii consolidate a Regulamentului (CE) nr. 152/2009. Neactualizarea anexelor ar duce la utilizarea unor metode depășite în controlul oficial al furajelor și la lipsa alinierii la standardele europene.

Opțiunea 2 – Elaborarea unui act normativ nou, separat

Această opțiune a fost respinsă pentru că structura și funcția HG nr. 686/2012 rămân valabile. Este necesară doar **actualizarea conținutului tehnic**, nu adoptarea unui act nou. Modificarea hotărârii existente este soluția proporțională și eficientă.

Opțiunea aleasă

A fost selectată **actualizarea HG nr. 686/2012**, prin introducerea ultimelor modificări ale Regulamentului (CE) nr. 152/2009, ca soluție tehnică adecvată și suficientă pentru menținerea conformității cu legislația UE.

4. Analiza impactului de reglementare

4.1. Impactul asupra sectorului public

Proiectul are un impact **minim și pozitiv** asupra sectorului public. Actualizarea HG nr. 686/2012 va permite ANSA să aplice în controlul oficial al furajelor **metodele europene actualizate**, contribuind la uniformizarea procedurilor și la creșterea calității analizelor.

Implementarea se realizează în cadrul proceselor deja existente, fără necesitatea resurselor noi sau suplimentare.

4.2. Impactul financiar și argumentarea costurilor estimative

Implementarea proiectului nu presupune cheltuieli suplimentare din bugetul public național. Activitățile de control și monitorizare vor fi efectuate de ANSA în cadrul bugetelor anuale aprobate.

4.3. Impactul asupra sectorului privat

Proiectul de hotărâre nu introduce obligații noi pentru operatorii economici din sectorul privat și nu modifică cerințele de fond aplicabile activităților de producere, import, comercializare sau utilizare a furajelor.

Impactul asupra sectorului privat este determinat de faptul că proiectul vizează actualizarea și clarificarea metodelor de control oficial utilizate de autoritatea competentă, prin alinierea acestora la versiunea consolidată a Regulamentului (CE) nr. 152/2009, fără a interveni asupra condițiilor de autorizare, funcționare sau conformare ale operatorilor economici.

4.4 Impactul Social

Proiectul de hotărâre are un impact social indirect pozitiv, prin consolidarea cadrului normativ aplicabil controlului oficial al furajelor și contribuția la menținerea unui nivel înalt de siguranță în lanțul alimentar, prin actualizarea metodelor de eșantionare și analiză utilizate în controlul oficial al furajelor.

4.4.1. Impactul asupra datelor cu caracter personal

Proiectul nu implică prelucrarea datelor cu caracter personal. Măsurile propuse vizează aspecte tehnice, fără colectarea sau procesarea informațiilor privind persoane fizice.

4.4.2. Impactul asupra echității și egalității de gen

Proiectul nu are impact diferențiat asupra femeilor, bărbaților sau altor grupuri sociale.

4.5. Impactul asupra mediului

Proiectul de hotărâre nu generează un impact direct semnificativ asupra mediului. Actul normativ are caracter tehnic și procedural, vizând actualizarea metodelor de eșantionare și analiză utilizate în cadrul controlului oficial al furajelor, fără a introduce activități noi sau modificări ale proceselor de producere, depozitare sau utilizare a furajelor care ar putea afecta mediul.

Implementarea proiectului nu implică:

- utilizarea suplimentară a resurselor naturale;
- creșterea emisiilor de gaze cu efect de seră;
- generarea de deșeuri suplimentare;
- impact negativ asupra biodiversității sau a ecosistemelor.

În mod indirect, prin îmbunătățirea controlului oficial al furajelor și prevenirea utilizării unor substanțe neconforme, proiectul contribuie la reducerea riscurilor potențiale de poluare și la protecția mediului înconjurător.

4.6. Alte impacturi și informații relevante

Proiectul de hotărâre nu generează alte impacturi economice sau sociale semnificative față de cele analizate anterior.

5. Compatibilitatea proiectului actului normativ cu legislația UE

Proiectul de hotărâre are relevanță directă pentru legislația Uniunii Europene, fiind elaborat în vederea asigurării compatibilității cadrului normativ național cu actele juridice ale UE în domeniul controlului oficial al furajelor. Prin proiect se realizează alinierea și actualizarea Hotărârii Guvernului nr. 686/2012, în scopul transpunerii corecte și complete a prevederilor aplicabile ale legislației UE.

5.1. Măsurile normative necesare pentru transpunerea actelor juridice ale UE în legislația națională

Actul juridic al Uniunii Europene care se transpune prin proiectul de hotărâre este Regulamentul (CE) nr. 152/2009 al Comisiei din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor, CELEX: 32009R0152, publicat în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*, seria L nr. 54 din 26 februarie 2009, cu modificările și completările ulterioare.

a) Obiectivele actului juridic al UE

Regulamentul (CE) nr. 152/2009 are ca obiectiv stabilirea unor **metode armonizate de eșantionare și analiză** aplicabile controlului oficial al furajelor, în vederea:

- asigurării unui nivel ridicat de protecție a sănătății animalelor și a consumatorilor;
- garantării comparabilității și fiabilității rezultatelor analizelor;
- aplicării uniforme a legislației UE în domeniul furajelor.

b) Gradul de transpunere a actului juridic al UE

Gradul de transpunere a Regulamentului (CE) nr. 152/2009 este integral.

Regulamentul a fost anterior transpus prin Hotărârea Guvernului nr. 686/2012, însă proiectul de față vizează:

- actualizarea cadrului normativ național;
- preluarea versiunii consolidate a regulamentului;
- substituirea integrală a anexelor, structurate și numerotate identic cu anexele actului UE.

c) Argumentarea introducerii unor reglementări care nu sunt prevăzute expres în actul juridic al UE

Proiectul nu introduce reglementări care să depășească cerințele stabilite de Regulamentul (CE) nr. 152/2009.

Prevederile proiectului au caracter tehnic și procedural și se limitează la transpunerea fidelă a dispozițiilor actului juridic al UE, fără adăugiri sau adaptări nejustificate.

5.2. Măsurile normative care urmăresc crearea cadrului juridic intern necesar pentru implementarea legislației UE

Prin modificarea Hotărârii Guvernului nr. 686/2012 se creează și se consolidează cadrul juridic intern necesar pentru **implementarea efectivă** a Regulamentului (CE) nr. 152/2009 în Republica Moldova.

Măsurile normative propuse asigură:

- aplicarea uniformă a metodelor de eșantionare și analiză în cadrul controlului oficial al furajelor;
- funcționarea eficientă a sistemului de control exercitat de autoritatea competentă;
- continuitatea și coerența cadrului normativ existent, fără adoptarea unui act normativ nou.

Proiectul nu necesită adoptarea unor acte normative suplimentare pentru implementarea prevederilor UE, întrucât:

- cadrul instituțional este deja stabilit;
- competențele autorității competente sunt clar definite;
- metodele prevăzute sunt aplicabile imediat după intrarea în vigoare a hotărârii.

6. Avizarea și consultarea publică a proiectului actului normativ

Întru respectarea prevederilor art.9 al Legii nr.239/2008 privind transparența în procesul decizional Anunțul de inițiere a elaborării proiectului la data de 21 ianuarie 2026

a fost plasat pe pagina web a Ministerului Agriculturii și Industriei Alimentare web: <https://particip.gov.md/ro/document/stages/anunt-privind-initierea-elaborarii-proiectului-de-hotarare-privind-modificarea-hotararii-de-guvern-n/15920> la compartimentul Transparență decizională, la rubrica Anunțuri de inițiere a elaborării deciziilor.

Proiectul va fi transmis oficial către principalele asociații de business relevante, avize formale vor fi recepționate și plasat anunțul de consultare, situația va fi reflectată în sinteza consultărilor.

7. Concluziile expertizelor

Proiectul urmează a fi supus expertizei anticorupție de către Centrul Național Anticorupție în conformitate cu art. 36 al Legii nr. 100/2017 cu privire la actele normative.

Proiectul urmează a fi supus expertizei de compatibilitate de către Centrul de Armonizare a Legislației în conformitate cu art. 35 al Legii nr. 100/2017 cu privire la actele normative.

Proiectul urmează a fi supus expertizei juridice de către Ministerul Justiției în conformitate cu art. 37 al Legii nr. 100/2017 cu privire la actele normative.

8. Modul de încorporare a actului în cadrul normativ existent

Proiectul Hotărârii Guvernului se încorporează în cadrul normativ existent prin **modificarea și completarea** Hotărârii Guvernului nr. 686 din 13 septembrie 2012 cu privire la aprobarea unor metode de analiză pentru controlul nutrețurilor.

Prin proiect:

- nu se abrogă Hotărârea Guvernului nr. 686/2012;
- se **actualizează conținutul normativ** al acesteia, în vederea alinierii la versiunea consolidată a Regulamentului (CE) nr. 152/2009;
- se **substituie integral anexele nr. 1–7** cu **anexele nr. 1–9**, structurate și numerotate conform actului juridic al Uniunii Europene.

Adoptarea proiectului nu implică modificarea sau abrogarea altor acte normative în vigoare și nu generează necesitatea elaborării unor acte normative conexe.

9. Măsurile necesare pentru implementarea prevederilor proiectului actului normativ

Implementarea prevederilor proiectului de Hotărâre a Guvernului va fi asigurată de **Agenția Națională pentru Siguranța Alimentelor**, în limitele competențelor sale legale.

Aplicarea proiectului nu necesită:

- crearea unor structuri instituționale noi;
- suplimentarea numărului de personal;
- alocarea unor resurse financiare suplimentare din bugetul public național.

Metodele de eșantionare și analiză prevăzute în anexele hotărârii sunt aplicate în cadrul activităților curente de control oficial și sunt utilizate de laboratoarele autorizate.

Monitorizarea implementării prevederilor proiectului se va realiza prin:

- activitatea curentă de control oficial desfășurată de autoritatea competentă;

- evaluarea rezultatelor controalelor și a conformității furajelor cu cerințele legale aplicabile.

Secretar de Stat

Iurie SCRIPNIC

Tabelul comparativ

a proiectului de modificare a Hotărârii de Guvern nr.686/2008 cu privire la aprobarea Normei sanitar-veterinare privind criteriile minime pentru protecția porcinelor destinate creșterii și îngrășării

Conținutul normei în vigoare	Modificarea propusă	Conținutul normei după modificare
Denumirea hotărârii: - cu privire la aprobarea unor metode de analiză pentru controlul nutrețurilor	În denumire și pe tot parcursul textul, textul „controlul nutrețurilor” la orice formă gramaticală se substituie cu cuvintele „controlul oficial al furajelor” la forma gramaticală corespunzătoare	Hotărârii de Guvern nr.686/2008 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor.
1. Se aprobă: Metodele de eșantionare pentru controlul oficial al nutrețurilor, în vederea determinării constituenților, inclusiv materialelor care conțin, constau sau sînt produse din organisme modificate genetic, a aditivilor pentru hrana animalelor, substanțelor nedorite și a reziduurilor de pesticide, conform anexei nr. 1; Metodele de preparare a eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor, conform anexei nr. 2; Metodele de analiză privind controlul compoziției materiilor prime pentru nutrețuri și a nutrețurilor combinate, conform anexei nr. 3; Metodele de analiză pentru controlul nivelului admisibil de aditivi în nutrețuri, conform anexei nr. 4;	Punctul 1, se substituie și va avea următorul cuprins: “ Metodele de eșantionare pentru controlul oficial al furajelor, în vederea determinării constituenților, inclusiv materialelor care conțin, constau sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), a aditivilor pentru hrana animalelor, a substanțelor nedorite și a reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, conform anexei nr. 1, cu excepția eșantionării pentru controlul contaminării microbiologice. Metoda de eșantionare stabilită în anexa nr.1 se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite în Regulamentul sanitar privind limitele maxime de reziduuri de pesticide din sau de pe produse alimentare și hrană de origine vegetală și animală pentru animale, aprobate prin Hotărârii Guvernului nr. 867/2023.	1. Se aprobă: Metodele de eșantionare pentru controlul oficial al furajelor, în vederea determinării constituenților, inclusiv materialelor care conțin, constau sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), a aditivilor pentru hrana animalelor, a substanțelor nedorite și a reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, conform anexei nr. 1, cu excepția eșantionării pentru controlul contaminării microbiologice. Metoda de eșantionare stabilită în anexa nr.1 se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite în Regulamentul sanitar privind limitele maxime de reziduuri de pesticide din sau de pe produse alimentare și hrană de origine vegetală și animală pentru animale, aprobate prin Hotărârii Guvernului nr. 867/2023.

Metodele de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în nutrețuri, conform anexei nr. 5; Metodele de analiză privind determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al nutrețurilor, conform anexei nr. 6; Metodele de determinare a valorii energetice a nutrețurilor combinate pentru păsările de crescătorie, conform anexei nr. 7.	Metodele de preparare a eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor, conform anexei nr. 2; Metodele de analiză privind controlul compoziției materiilor prime pentru furaje și a furajelor combinate, conform anexei nr. 3 Metodele de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje, conform anexei nr. 4; Metodele de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje, conform anexei nr. 5; Metodele de analiză privind determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor, conform anexei nr.6 ; Metodele de determinare a valorii energetice a furajelor combinate pentru păsările de crescătorie, conform anexei nr. 7.”	Metodele de preparare a eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor, conform anexei nr. 2; Metodele de analiză privind controlul compoziției materiilor prime pentru furaje și a furajelor combinate, conform anexei nr. 3 Metodele de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje, conform anexei nr. 4; Metodele de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje, conform anexei nr. 5; Metodele de analiză privind determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor, conform anexei nr.6 ; Metodele de determinare a valorii energetice a furajelor combinate pentru păsările de crescătorie, conform anexei nr. 7.”

TABEL DE CONCORDANȚĂ

a proiectului de hotărâre de modificare a Hotărârea Guvernului nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor

1	Regulamentul nr. 152/2009/CE din 27 ianuarie 2009 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene seria L nr. 54 din 26 februarie 2009 cu modificările ulterioare.
2	Proiectului de hotărâre de modificare a Hotărârea Guvernului nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor.
3	Gradul general de compatibilitate - compatibil
4	Autoritatea/persoana responsabilă, MAIA – Rodica FOTESCU
5	Data întocmirii/actualizării 28.01.2026

Actul Uniunii Europene	Proiectul de act normativ național	Gradul de compatibilitate	Observațiile
6	7	8	9
Articolul 1 ▼M9 Eșantionarea pentru controlul oficial al furajelor, în special în ceea ce privește determinarea constituenților, inclusiv materialele care conțin, constau în sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), aditivii pentru hrana animalelor, astfel cum sunt definiți în Regulamentul (CE) nr. 1831/2003 al Parlamentului European și al Consiliului (1), substanțele nedorite, astfel cum sunt definite de Directiva 2002/32/CE a Parlamentului European și a Consiliului (2), se efectuează în conformitate cu metodele prevăzute în anexa I, cu excepția eșantionării pentru controlul contaminării microbiologice. ▼M3	Metodele de eșantionare pentru controlul oficial al furajelor, în vederea determinării constituenților, inclusiv materialelor care conțin, constau sau sunt produse din organisme modificate genetic (OMG), a aditivilor pentru hrana animalelor, a substanțelor nedorite și a reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite la Cerințele sanitare-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, conform anexei nr. 1, cu excepția eșantionării pentru controlul contaminării microbiologice. Metoda de eșantionare stabilită în anexa nr.1 se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide astfel cum sunt definite în	Compatibil	

Metoda de eșantionare stabilită în anexa I se aplică pentru controlul furajelor în ceea ce privește determinarea reziduurilor de pesticide, astfel cum sunt definite în Regulamentul (CE) nr. 396/2005 al Parlamentului European și al Consiliului (3) și controlul privind conformitatea cu Regulamentul (UE) nr. 619/2011.	Regulamentul sanitar privind limitele maxime de reziduuri de pesticide din sau de pe produse alimentare și hrană de origine vegetală și animală pentru animale, aprobate prin Hotărârii Guvernului nr. 867/2023.	Compatibil	
<i>Articolul 2</i> Prepararea eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor se efectuează în conformitate cu metodele descrise în anexa II.	Metodele de preparare a eșantioanelor pentru analiză și exprimarea rezultatelor, conform anexei nr. 2;	Compatibil	
<i>Articolul 3</i> Analizele pentru controlul oficial al furajelor se efectuează utilizând metodele descrise în anexa III (Metode de analiză pentru controlul compoziției materiilor prime furajere și a furajelor combinate), anexa IV (Metode de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje), anexa V (Metode de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje) și anexa VI (Metode de analiză pentru determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor).	Metodele de analiză privind controlul compoziției materiilor prime pentru furaje și a furajelor combinate, conform anexei nr. 3 Metodele de analiză pentru controlul nivelului de aditivi autorizați în furaje, conform anexei nr. 4; Metodele de analiză pentru controlul substanțelor nedorite în furaje, conform anexei nr. 5; Metodele de analiză privind determinarea constituenților de origine animală pentru controlul oficial al furajelor, conform anexei nr.6 ;	Compatibil	
<i>Articolul 4</i> Valoarea energetică a furajelor combinate pentru păsări de crescătorie se calculează în conformitate cu anexa VII.	Metodele de determinare a valorii energetice a furajelor combinate pentru păsările de crescătorie, conform anexei nr. 7.”	Compatibil	

<i>Articolul 5</i> Metodele de analiză pentru controlul prezenței ilegale a aditivilor care nu mai sunt autorizați pentru furaje, descrise în anexa VIII, se utilizează în scop de confirmare.		Norme UE neaplicabile	
<i>Articolul 6</i> Directivele 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE, 81/715/CEE, 84/425/CEE, 86/174/CEE, 93/70/CEE, 93/117/CE, 98/64/CE, 1999/27/CE, 1999/76/CE, 2000/45/CE, 2002/70/CE și 2003/126/CE se abrogă. Trimiterile la directivele abrogate se interpretează ca trimiteri la prezentul regulament și se citesc în conformitate cu tabelul de corespondență din anexa IX.		Norme UE neaplicabile	
<i>Articolul 7</i> Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene. Se aplică de la 26 august 2009. Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.		Norme UE neaplicabile	

ANEXA I METODE DE EȘANTIONARE 1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE Eșantioanele destinate controlului oficial al furajelor se prelevează în conformitate cu metodele descrise în continuare. Eșantioanele astfel prelevate se consideră reprezentative pentru loturile eșantionate. Scopul eșantionării reprezentative este de a obține o mică fracțiune dintr-un lot în așa fel încât determinarea oricărei caracteristici speciale a acestei fracțiuni va reprezenta valoarea medie a caracteristicii lotului. Lotul se eșantionează prin prelevarea în mod repetat de eșantioane elementare, la diferite poziții unice din lot. Aceste eșantioane elementare sunt combinate prin amestecare pentru a forma un eșantion agregat pornind de la care sunt pregătite eșantioane finale reprezentative prin divizare reprezentativă. În cazul în care, printr-o inspecție vizuală sau pe baza altor informații relevante, porțiuni din furajele care urmează să fie eșantionate arată o diferență de calitate față de restul furajelor din același lot, aceste fragmente se separă de restul de furaje și se tratează ca sublot separat. În cazul în care nu este posibilă separarea furajului în subloturi separate, el se eșantionează ca un singur lot. În astfel de cazuri, se menționează acest fapt în raportul de eșantionare. În cazul în care un furaj eșantionat în conformitate cu dispozițiile prezentului regulament este identificat ca neîndeplinind cerințele UE și face parte dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. Eșantionarea poate include, de asemenea, furajele oferite spre vânzare de către operatorii din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță în conformitate cu	Anexă nr.1 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor METODE DE EȘANTIONARE 1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE Eșantioanele destinate controlului oficial al furajelor se prelevează în conformitate cu metodele descrise în continuare. Eșantioanele astfel prelevate se consideră reprezentative pentru loturile eșantionate. Scopul eșantionării reprezentative este de a obține o mică fracțiune dintr-un lot în așa fel încât determinarea oricărei caracteristici speciale a acestei fracțiuni va reprezenta valoarea medie a caracteristicii lotului. Lotul se eșantionează prin prelevarea în mod repetat de eșantioane elementare, la diferite poziții unice din lot. Aceste eșantioane elementare sunt combinate prin amestecare pentru a forma un eșantion agregat pornind de la care sunt pregătite eșantioane finale reprezentative prin divizare reprezentativă. În cazul în care, printr-o inspecție vizuală sau pe baza altor informații relevante, porțiuni din furajele care urmează să fie eșantionate arată o diferență de calitate față de restul furajelor din același lot, aceste fragmente se separă de restul de furaje și se tratează ca sublot separat. În cazul în care nu este posibilă separarea furajului în subloturi separate, el se eșantionează ca un singur lot. În astfel de cazuri, se menționează acest fapt în raportul de eșantionare. În cazul în care un furaj eșantionat în conformitate cu dispozițiile prezentei hotărâri este identificat ca neîndeplinind cerințele ei și face parte dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate,	Compatibil	

articolul 11 alineatul (3) din Regulamentul (CE) nr. 767/2009 al Parlamentului European și al Consiliului (⁴). Eșantionarea furajelor oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță face, în principiu, obiectul punctelor prevăzute în prezenta anexă. Aspectele specifice ale eșantionării în cazul eșantioanelor din vânzare la distanță sunt descrise la punctul 11. 2. DEFINIȚII — Lot: o cantitate identificabilă de furaj având anumite caracteristici comune confirmate, precum originea, varietatea, tipul ambalajului, ambalatorul, expeditorul sau etichetarea și, în cazul unui proces de producție, o unitate de producție provenind dintr-o singură instalație care utilizează parametri de producție uniformi sau mai multe astfel de unități, dacă sunt produse în mod continuu și depozitate împreună. — Lot eșantionat: un lot sau o parte identificată din lot sau sublot. — Eșantion sigilat: un eșantion sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul. — Eșantion elementar: o cantitate prelevată dintr-un punct al lotului eșantionat. — Eșantion agregat: o combinație de eșantioane elementare prelevate din același lot eșantionat. — Eșantion redus: o parte dintr-un eșantion agregat, obținută din acesta printr-un proces de reducere reprezentativă. — Eșantion final: o parte din eșantionul agregat (amestecat), din eșantionul redus sau din eșantionul agregat omogenizat, în funcție de tipul de control (a se vedea punctul 9.4). — Eșantion de laborator: un eșantion destinat laboratorului (astfel cum este primit de laborator) și care poate fi eșantionul final, redus sau agregat. — Eșantion din vânzare la distanță: un eșantion dintr-un lot de furaje oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță.	nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele din prezenta anexă. Eșantionarea poate include, de asemenea, furajele oferite spre vânzare de către operatorii din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță în conformitate cu pct.22 la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, conform Hotărârii Guvernului nr.910/2020. Eșantionarea furajelor oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță face, în principiu, obiectul punctelor prevăzute în prezenta anexă. Aspectele specifice ale eșantionării în cazul eșantioanelor din vânzare la distanță sunt descrise la punctul 11. 2. DEFINIȚII Lot - o cantitate identificabilă de furaj având anumite caracteristici comune confirmate, precum originea, varietatea, tipul ambalajului, ambalatorul, expeditorul sau etichetarea și, în cazul unui proces de producție, o unitate de producție provenind dintr-o singură instalație care utilizează parametri de producție uniformi sau mai multe astfel de unități, dacă sunt produse în mod continuu și depozitate împreună. Lot eșantionat - un lot sau o parte identificată din lot sau sublot. Eșantion sigilat - un eșantion sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul. Eșantion elementar - o cantitate prelevată dintr-un punct al lotului eșantionat. Eșantion agregat - o combinație de eșantioane elementare prelevate din același lot eșantionat. Eșantion redus - o parte dintr-un eșantion agregat, obținută din acesta printr-un proces de reducere reprezentativă.	

3. DISPOZIȚII GENERALE

— Eșantioanele se prelevează de către personal autorizat în acest sens de către autoritatea competentă.

— Pentru un eșantion din vânzare la distanță, o cantitate de furaj este solicitată operatorului din sectorul hranei pentru animale de către autoritatea competentă prin mijloace de comunicare la distanță.

— Eșantionul trebuie să fie sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul.

Marcajul sigiliului trebuie să poată fi identificat în mod clar și vizibil.

— Identificarea eșantionului: eșantionul trebuie să poarte un marcaj de neșters și trebuie să fie identificat astfel încât să existe o legătură lipsită de ambiguitate cu raportul de eșantionare.

— Din fiecare eșantion agregat sau redus se prelevează următoarele eșantioane finale: unul pentru control (asigurarea respectării legislației) și unul pentru operatorul din sectorul hranei pentru animale (apărare). În final, poate fi prelevat încă un eșantion final pentru referință. În cazul în care eșantionul agregat complet se omogenizează, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat, cu excepția cazului în care această procedură este contrară reglementărilor statelor membre în ceea ce privește dreptul operatorului din sectorul hranei pentru animale.

— În conformitate cu articolul 15 alineatele (1) și (2) din Regulamentul (UE) 2017/625, atunci când acest lucru este necesar pentru efectuarea eșantionării oficiale, operatorii din sectorul hranei pentru animale, la cererea autorităților competente:

— acordă personalului autorităților competente acces la echipamentele aflate sub controlul lor, inclusiv, atunci când

Eșantion final - o parte din eșantionul agregat (amestecat), din eșantionul redus sau din eșantionul agregat omogenizat, în funcție de tipul de control (a se vedea punctul 9.4).

Eșantion de laborator - un eșantion destinat laboratorului (astfel cum este primit de laborator) și care poate fi eșantionul final, redus sau agregat.

Eșantion din vânzare la distanță - un eșantion dintr-un lot de furaje oferite spre vânzare prin mijloace de comunicare la distanță.

3. DISPOZIȚII GENERALE

Eșantioanele se prelevează de către personal autorizat în acest sens de către autoritatea competentă.

Pentru un eșantion din vânzare la distanță, o cantitate de furaj este solicitată operatorului din sectorul hranei pentru animale de către autoritatea competentă prin mijloace de comunicare la distanță.

Eșantionul trebuie să fie sigilat astfel încât să se împiedice orice acces la eșantion fără a se distruge sau a se elimina sigiliul.

Marcajul sigiliului trebuie să poată fi identificat în mod clar și vizibil.

Identificarea eșantionului: eșantionul trebuie să poarte un marcaj de neșters și trebuie să fie identificat astfel încât să existe o legătură lipsită de ambiguitate cu raportul de eșantionare.

Din fiecare eșantion agregat sau redus se prelevează următoarele eșantioane finale: unul pentru control (asigurarea respectării legislației) și unul pentru operatorul din sectorul hranei pentru animale (apărare). În final, poate fi prelevat încă un eșantion final pentru referință. În cazul în care eșantionul agregat complet se omogenizează, eșantioanele finale sunt prelevate din eșantionul agregat omogenizat, cu excepția cazului în care această procedură

este necesar, pun la dispoziție echipament adecvat de eșantionare și echipamentul individual de protecție; — acordă asistență personalului autorităților competente și cooperează cu acesta pentru a permite eșantionarea, inclusiv punerea la dispoziția personalului autorităților competente a furajelor. 4. APARATURA <i>4.1. Aparatura de prelevare de eșantioane trebuie să fie realizată din materiale care nu contaminează produsele de eșantionat. Aparatura care este destinată a fi utilizată de mai multe ori trebuie să fie ușor de curățat pentru a evita contaminarea încrucișată.</i> <i>4.2. Aparatura recomandată pentru prelevarea eșantioanelor din furaje solide</i> 4.2.1. Prelevarea manuală 4.2.1.1. Lopată plată cu margini verticale. 4.2.1.2. Sondă de eșantionare cu o fantă lungă sau compartimentată. Dimensiunile sondei de eșantionare trebuie să fie adecvate caracteristicilor lotului eșantionat (adâncimea recipientului, dimensiunile sacului etc.) și dimensiunilor particulelor furajului. În cazul în care sonda de eșantionare are mai multe orificii, pentru a se asigura faptul că eșantionul este prelevat în diferite locuri de-a lungul sondei, orificiile ar trebui să fie separate prin compartimente sau orificii eșalonate secvențial. 4.2.2. Prelevarea mecanică Pentru prelevarea de eșantioane din furajele în mișcare poate fi utilizată aparatură mecanică adecvată. Aparatul mecanic este considerat adecvat dacă cel puțin întreaga secțiune a fluxului este eșantionată. Prelevarea de eșantioane din furajele în mișcare (la rate de debit ridicat) poate fi efectuată de prelevatoare automate. 4.2.3. Separator	este contrară reglementărilor în ceea ce privește dreptul operatorului din sectorul hranei pentru animale. În conformitate cu art. 15 alin. (1) și (2) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, atunci când acest lucru este necesar pentru efectuarea eșantionării oficiale, operatorii din sectorul hranei pentru animale, la cererea autorităților competente: - acordă personalului autorităților competente acces la echipamentele aflate sub controlul lor, inclusiv, atunci când este necesar, pun la dispoziție echipament adecvat de eșantionare și echipamentul individual de protecție; - acordă asistență personalului autorităților competente și cooperează cu acesta pentru a permite eșantionarea, inclusiv punerea la dispoziția personalului autorităților competente a furajelor. 4. APARATURA 4.1. Aparatura de prelevare de eșantioane trebuie să fie realizată din materiale care nu contaminează produsele de eșantionat. Aparatura care este destinată a fi utilizată de mai multe ori trebuie să fie ușor de curățat pentru a evita contaminarea încrucișată. 4.2. Aparatura recomandată pentru prelevarea eșantioanelor din furaje solide 4.2.1. Prelevarea manuală 4.2.1.1. Lopată plată cu margini verticale. 4.2.1.2. Sondă de eșantionare cu o fantă lungă sau compartimentată. Dimensiunile sondei de eșantionare trebuie să fie adecvate caracteristicilor lotului eșantionat (adâncimea recipientului, dimensiunile sacului etc.) și dimensiunilor particulelor furajului. 4.2.1.3 În cazul în care sonda de eșantionare are mai multe orificii, pentru a se asigura faptul că eșantionul este prelevat în diferite locuri de-a lungul sondei, orificiile ar trebui să fie separate prin compartimente sau orificii eșalonate secvențial.		

În cazul în care acest lucru este posibil și oportun, aparatura destinată divizării eşantionului în părți aproximativ egale trebuie să fie utilizată pentru prepararea eşantioanelor reduse în mod reprezentativ. 5. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE NUMĂRUL DE EȘANTIOANE ELEMENTARE — Cerințele cantitative la punctele 5.1 și 5.2 în ceea ce privește numărul de eşantioane elementare sunt aplicabile pentru loturile eşantionate cu dimensiuni de până la maximum 500 de tone și care pot fi eşantionate în mod reprezentativ. Procedura de eşantionare descrisă este, de asemenea, valabilă pentru cantități mai mari decât dimensiunea maximă a lotului eşantionat cu condiția ca numărul maxim de eşantioane elementare indicate în următoarele tabele la punctele 5.1.1, 5.1.3 și 5.1.5 să fie ignorată, numărul de eşantioane elementare fiind determinat prin formula cu rădăcina pătrată prevăzută în partea corespunzătoare a procedurii (a se vedea punctul 5.3) și dimensiunea minimă a eşantionului agregat să fi crescut proporțional. Acest lucru nu împiedică împărțirea unui lot mare în subloturi mai mici și eşantionarea fiecărui sublot în conformitate cu procedura descrisă la punctele 5.1 și 5.2. — Dimensiunea lotului eşantionat trebuie să permită eşantionarea fiecăreia dintre părțile sale constituente. — Pentru loturile sau subloturile foarte mari (> 500 de tone) și pentru loturile care sunt transportate sau depozitate în așa fel încât eşantionarea nu poate fi efectuată în conformitate cu procedura de eşantionare prevăzută la punctele 5.1 și 5.2 de la prezentul punct, trebuie aplicată procedura de eşantionare prevăzută la punctul 5.3. — În cazul eşantioanelor din vânzările la distanță, de obicei autoritatea competentă nu cunoaște dimensiunea lotului din care se solicită cantitatea. Prin urmare, procedura menționată la punctele 5.1 și 5.2 nu poate fi utilizată. În acest caz, se aplică procedura descrisă la punctul 11.	4.2.2. Prelevarea mecanică Pentru prelevarea de eşantioane din furajele în mișcare poate fi utilizată aparatură mecanică adecvată. Aparatul mecanic este considerat adecvat dacă cel puțin întreaga secțiune a fluxului este eşantionată. Prelevarea de eşantioane din furajele în mișcare (la rate de debit ridicat) poate fi efectuată de prelevatoare automate. 4.2.3. Separator În cazul în care acest lucru este posibil și oportun, aparatura destinată divizării eşantionului în părți aproximativ egale trebuie să fie utilizată pentru prepararea eşantioanelor reduse în mod reprezentativ. 5. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE NUMĂRUL DE EȘANTIOANE ELEMENTARE — Cerințele cantitative la punctele 5.1 și 5.2 în ceea ce privește numărul de eşantioane elementare sunt aplicabile pentru loturile eşantionate cu dimensiuni de până la maximum 500 de tone și care pot fi eşantionate în mod reprezentativ. Procedura de eşantionare descrisă este, de asemenea, valabilă pentru cantități mai mari decât dimensiunea maximă a lotului eşantionat cu condiția ca numărul maxim de eşantioane elementare indicate în următoarele tabele la punctele 5.1.1, 5.1.3 și 5.1.5 să fie ignorată, numărul de eşantioane elementare fiind determinat prin formula cu rădăcina pătrată prevăzută în partea corespunzătoare a procedurii (a se vedea punctul 5.3) și dimensiunea minimă a eşantionului agregat să fi crescut proporțional. Acest lucru nu împiedică împărțirea unui lot mare în subloturi mai mici și eşantionarea fiecărui sublot în conformitate cu procedura descrisă la punctele 5.1 și 5.2. — Dimensiunea lotului eşantionat trebuie să permită eşantionarea fiecăreia dintre părțile sale constituente. — Pentru loturile sau subloturile foarte mari (> 500 de tone) și pentru loturile care sunt transportate sau depozitate în așa	

— În cazul în care legislația impune operatorului din sectorul hranei pentru animale să se conformeze prezentului regulament în cadrul unui sistem de monitorizare obligatorie, operatorul din sectorul hranei pentru animale se poate abate de la cerințele cantitative prevăzute la prezentul punct pentru a lua în considerare caracteristicile operaționale, cu condiția ca el să fi demonstrat, într-un mod satisfăcător pentru autoritatea competentă, echivalența procedurii de eșantionare în ceea ce privește reprezentativitatea și după autorizarea din partea autorității competente.

— În cazuri excepționale, dacă nu este posibil să se aplice metoda de eșantionare prevăzută în ceea ce privește cerințele cantitative din cauza unei deteriorări comerciale inacceptabile a lotului (din cauza formelor ambalajului, a mijlocului de transport, a modului de depozitare etc.), se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare cu condiția ca aceasta să fie cât mai reprezentativă posibil și să fie descrisă și documentată integral.

5.1. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje.

5.1.1. Furaje vrac solide

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	√ (20 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) (*1), până la 40 de eșantioane elementare

fel încât eșantionarea nu poate fi efectuată în conformitate cu procedura de eșantionare prevăzută la punctele 5.1 și 5.2 de la prezentul punct, trebuie aplicată procedura de eșantionare prevăzută la punctul 5.3.

— În cazul eșantioanelor din vânzările la distanță, de obicei autoritatea competentă nu cunoaște dimensiunea lotului din care se solicită cantitatea. Prin urmare, procedura menționată la punctele 5.1 și 5.2 nu poate fi utilizată. În acest caz, se aplică procedura descrisă la punctul 11.

— În cazul în care legislația impune operatorului din sectorul hranei pentru animale să se conformeze prezentei anexe în cadrul unui sistem de monitorizare obligatorie, operatorul din sectorul hranei pentru animale se poate abate de la cerințele cantitative prevăzute la prezentul punct pentru a lua în considerare caracteristicile operaționale, cu condiția ca el să fi demonstrat, într-un mod satisfăcător pentru autoritatea competentă, echivalența procedurii de eșantionare în ceea ce privește reprezentativitatea și după autorizarea din partea autorității competente.

— În cazuri excepționale, dacă nu este posibil să se aplice metoda de eșantionare prevăzută în ceea ce privește cerințele cantitative din cauza unei deteriorări comerciale inacceptabile a lotului (din cauza formelor ambalajului, a mijlocului de transport, a modului de depozitare etc.), se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare cu condiția ca aceasta să fie cât mai reprezentativă posibil și să fie descrisă și documentată integral.

5.1. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul substanțelor sau produselor uniform distribuite în furaje.

5.1.1. Furaje vrac solide

(*1) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	
5.1.2. Furaje vrac lichide	
Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
≤ 2,5 tone sau ≤ 2 500 de litri	4 (*1)
> 2,5 tone sau > 2 500 de litri	7 (*1)
(*1) În cazul în care nu este posibil să se obțină omogenizarea lichidului, numărul de eșantioane elementare trebuie mărit.	
5.1.3. Furaje ambalate	
Furajele (solide și lichide) pot fi ambalate în pungi, saci, cutii de metal, cuve etc. care sunt menționate în următorul tabel ca unități. Unitățile mari (≥ 500 kg sau litri) trebuie să fie eșantionate în conformitate cu dispozițiile prevăzute pentru furaje vrac (a se vedea punctele 5.1.1 și 5.1.2)	
Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de unități din care trebuie prelevat (cel puțin) un eșantion elementar (*1)
1 -20 de unități	1 unitate (*2)
21 -150 de unități	3 unități (*2)

Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	√ (20 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) (*1), până la 40 de eșantioane elementare
(*1) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	
5.1.2. Furaje vrac lichide	
Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare
≤ 2,5 tone sau ≤ 2 500 de litri	4 (*1)
> 2,5 tone sau > 2 500 de litri	7 (*1)
(*1) În cazul în care nu este posibil să se obțină omogenizarea lichidului, numărul de eșantioane elementare trebuie mărit.	
5.1.3. Furaje ambalate	
Furajele (solide și lichide) pot fi ambalate în pungi, saci, cutii de metal, cuve etc. care sunt menționate în următorul tabel ca unități. Unitățile mari (≥ 500 kg sau litri) trebuie să fie	

151 -400 de unități	5 unități (*2)
> 400 de unități	¼ din √ (numărul de unități care compun lotul eşantionat) (*3), până la 40 de unități
(*1) În cazul în care deschiderea unei unități ar putea afecta analiza (de exemplu, în cazul furajelor umede perisabile), un eşantion elementar va fi reprezentat de unitatea nedeschisă. (*2) Pentru unitățile al căror conținut nu depășește 1 kg sau un litru, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originale. (*3) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	

5.1.4. Blocuri de furaje și brichete minerale
Minimum un bloc sau o brichetă trebuie eşantionat(ă) per lot eşantionat de 25 de unități, până la un maximum de patru blocuri sau brichete.
În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.

5.1.5. Furaje grosiere/nutreț	
Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de eşantioane elementare (*1)
≤ 5 tone	5

eşantionate în conformitate cu dispozițiile prevăzute pentru furaje vrac (a se vedea punctele 5.1.1 și 5.1.2)

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de unități din care trebuie prelevat (cel puțin) un eşantion elementar (*1)
1 -20 de unități	1 unitate (*2)
21 -150 de unități	3 unități (*2)
151 -400 de unități	5 unități (*2)
> 400 de unități	¼ din √ (numărul de unități care compun lotul eşantionat) (*3), până la 40 de unități
(*1) În cazul în care deschiderea unei unități ar putea afecta analiza (de exemplu, în cazul furajelor umede perisabile), un eşantion elementar va fi reprezentat de unitatea nedeschisă. (*2) Pentru unitățile al căror conținut nu depășește 1 kg sau un litru, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originale. (*3) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.	

5.1.4. Blocuri de furaje și brichete minerale

Minimum un bloc sau o brichetă trebuie eşantionat(ă) per lot eşantionat de 25 de unități, până la un maximum de patru blocuri sau brichete.

> 5 tone	√ (5 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) (*2), până la 40 de eșantioane elementare	În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete.		
(*1) Este recunoscut faptul că în anumite situații (de exemplu, furaje însilozate) nu este posibil să se preleveze eșantioanele elementare necesare, fără a cauza daune inacceptabile pentru lot. În astfel de situații se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare, iar un ghid pentru eșantionarea unor astfel de loturi a fost elaborat și este disponibil la următorul link https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf (*2) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.				

5.2. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje

Aceste cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare trebuie utilizate în următoarele situații:
— controlul aflatoxinelor, al cornului-secarei, al altor micotoxine și impurități botanice dăunătoare în materiile prime furajere;
— controlul contaminării încrucișate printr-un constituent, inclusiv material MG, sau substanță pentru care este preconizată o distribuție neuniformă în furaje.
În cazul în care autoritatea de control are serioase suspiciuni privind apariția unei astfel de distribuții neuniforme și în cazul unei contaminări încrucișate printr-un constituent sau printr-o substanță într-un furaj combinat, se pot aplica cerințele cantitative, astfel cum sunt prevăzute în următorul tabel.

5.1.5. Furaje grosiere/nutreț	
Dimensiunea lotului eșantionat	Număr minim de eșantioane elementare (*1)
≤ 5 tone	5
> 5 tone	√ (5 înmulțit cu numărul de tone care compun lotul eșantionat) (*2), până la 40 de eșantioane elementare

(*1) Este recunoscut faptul că în anumite situații (de exemplu, furaje însilozate) nu este posibil să se preleveze eșantioanele elementare necesare, fără a cauza daune inacceptabile pentru lot. În astfel de situații se poate aplica o metodă alternativă de eșantionare, iar un ghid pentru eșantionarea unor astfel de loturi a fost elaborat și este disponibil la următorul link
https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

(*2) În cazul în care numărul obținut este o fracție, aceasta se rotunjește la numărul întreg imediat superior.

5.2. Cerințe cantitative în ceea ce privește eșantioanele elementare legate de controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în masa de furaje

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de eşantioane elementare
< 80 de tone	A se vedea cerințe cantitative de la punctul 5.1. Numărul de eşantioane elementare care trebuie prelevate trebuie să fie înmulțit cu 2,5.
≥ 80 de tone	100

5.3. Cerințe cantitative în ceea ce privește eşantioanele elementare în cazul loturilor de dimensiuni foarte mari
 În cazul loturilor mari eşantionate (loturi eşantionate > 500 de tone), numărul de eşantioane elementare care trebuie prelevate = 40 de eşantioane elementare + √ tone în ceea ce privește controlul substanțelor sau produselor distribuite uniform în masa de furaje sau 100 de eşantioane elementare + √ tone în ceea ce privește controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în furaje.

6. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIONUL AGREGAT
 Este necesar un singur eşantion agregat per lot eşantionat.

	Natura furajelor	Dimensiunea minimă a eşantionului agregat (*1)(*2)
6.1.	Furaje vrac	4 kg
6.2.	Furaje ambalate:	4 kg (*3)

Aceste cerințe cantitative în ceea ce privește eşantioanele elementare trebuie utilizate în următoarele situații:
 — controlul aflatoxinelor, al cornului-secarei, al altor micotoxine și impurități botanice dăunătoare în materiile prime furajere;
 — controlul contaminării încrucișate printr-un constituent, inclusiv material MG, sau substanță pentru care este preconizată o distribuție neuniformă în furaje.
 În cazul în care autoritatea de control are serioase suspiciuni privind apariția unei astfel de distribuții neuniforme și în cazul unei contaminări încrucișate printr-un constituent sau printr-o substanță într-un furaj combinat, se pot aplica cerințele cantitative, astfel cum sunt prevăzute în următorul tabel.

Dimensiunea lotului eşantionat	Număr minim de eşantioane elementare
< 80 de tone	A se vedea cerințe cantitative de la punctul 5.1. Numărul de eşantioane elementare care trebuie prelevate trebuie să fie înmulțit cu 2,5.
≥ 80 de tone	100

5.3. Cerințe cantitative în ceea ce privește eşantioanele elementare în cazul loturilor de dimensiuni foarte mari
 În cazul loturilor mari eşantionate (loturi eşantionate > 500 de tone), numărul de eşantioane elementare care trebuie prelevate = 40 de eşantioane elementare + √ tone în ceea ce privește controlul substanțelor sau produselor distribuite uniform în masa de furaje sau 100 de eşantioane elementare

6.3.	Furaje lichide sau semilichide:	4 litri	+ √ tone în ceea ce privește controlul constituenților sau substanțelor care pot fi distribuite neuniform în furaje. 6. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIONUL AGREGAT Este necesar un singur eșantion agregat per lot eșantionat.		
6.4.	Blocuri de furaje sau brichete minerale:				
6.4.1.	cântărind mai mult de 1 kg fiecare	4 kg			
6.4.2.	cântărind cel mult 1 kg fiecare	greutatea a patru blocuri sau brichete originale			
6.5.	Furaje grosiere/nutreț	4 kg (*)			
(*) În cazul în furajele eșantionate au o valoare ridicată, se prelevează o cantitate mai mică de eșantion agregat cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.					
(*) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) 619/2011 al Comisiei din 24 iunie 2011 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor în vederea detectării materialului modificat genetic pentru care o procedură de autorizare este în curs de desfășurare sau a cărui autorizare a expirat (JO L 166, 25.6.2011, p. 9), eșantionul agregat pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului agregat trebuie să fie de cel puțin 10,5 kg și pentru soia de 7 kg. Pentru alte semințe și boabe, precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului agregat de 4 kg corespunde unui număr de peste 35 000 de semințe/boabe.					

Natura furajelor	Dimensiunea minimă a eșantionului agregat (*) (*)
6.1.	Furaje vrac
6.2.	Furaje ambalate:
6.3.	Furaje lichide sau semilichide:
6.4.	Blocuri de furaje sau brichete minerale:
6.4.1.	cântărind mai mult de 1 kg fiecare
6.4.2.	cântărind cel mult 1 kg fiecare
6.5.	Furaje grosiere/nutreț
(*) În cazul în furajele eșantionate au o valoare ridicată, se prelevează o cantitate mai mică de eșantion agregat cu condiția ca aceasta să fie descrisă și documentată în raportul de eșantionare.	
(*) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) 619/2011 al Comisiei din 24 iunie 2011 de stabilire a metodelor de eșantionare și analiză pentru controlul oficial al furajelor în vederea detectării materialului modificat genetic pentru care o procedură de autorizare este în curs de desfășurare sau a cărui autorizare a expirat (JO L 166, 25.6.2011, p. 9), eșantionul agregat pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimensiunea eșantionului agregat trebuie să fie de cel puțin 10,5 kg și pentru soia de 7 kg. Pentru alte semințe și boabe, precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eșantionului agregat de 4 kg corespunde unui număr de peste 35 000 de semințe/boabe.	

(*3) În cazul furajelor ambalate, poate fi posibil, de asemenea, să nu se atingă dimensiunea de 4 kg pentru eşantionul agregat în funcție de dimensiunea unităților individuale. (*4) În cazul în care se referă la furajele grosiere sau la nutreț cu o densitate specifică redusă (de exemplu, fân, paie), eşantionul agregat trebuie să aibă o dimensiune minimă de 1 kg.	orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, dimensiunea eşantionului agregat de 4 kg corespunde unui număr de peste 35 000 de semințe/boabe. (*3) În cazul furajelor ambalate, poate fi posibil, de asemenea, să nu se atingă dimensiunea de 4 kg pentru eşantionul agregat în funcție de dimensiunea unităților individuale. (*4) În cazul în care se referă la furajele grosiere sau la nutreț cu o densitate specifică redusă (de exemplu, fân, paie), eşantionul agregat trebuie să aibă o dimensiune minimă de 1 kg.									
7. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIOANELE FINALE <i>Eșantioane finale</i> Este necesară analiza a cel puțin un eşantion final. Cantitatea din eşantionul final de analizat nu poate fi mai mică decât cantitățile de mai jos: <table><tr><td>Furaje solide</td><td>500 g (*1)</td></tr><tr><td>Furaje lichide sau semilichide</td><td>500 ml (*1)</td></tr></table> (*1) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) nr. 61 pentru controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să fie de cel puțin 3 000 g și pentru soia de 2 000 g. Pentru precum orzul, meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de eşantionului final de 500 g corespunde unui număr de peste 10 000 de semințe/boabe. (*2) În cazul în care dimensiunea eşantionului agregat este sem sau litri (a se vedea notele de subsol de la punctul 6), se poate p cantitate mai mică de eşantion final, cu condiția ca aceasta să fi raportul de eşantionare.	Furaje solide	500 g (*1)	Furaje lichide sau semilichide	500 ml (*1)	7. CERINȚE CANTITATIVE ÎN CEEA CE PRIVEȘTE EȘANTIOANELE FINALE <i>Eșantioane finale</i> Este necesară analiza a cel puțin un eşantion final. Cantitatea din eşantionul final de analizat nu poate fi mai mică decât cantitățile de mai jos: <table><tr><td>Furaje solide</td><td>500</td></tr><tr><td>Furaje lichide sau semilichide</td><td>500</td></tr></table> (*1) În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) nr. controlul prezenței materialului modificat genetic trebuie să de semințe/boabe. Aceasta înseamnă că pentru porumb dimer fie de cel puțin 3 000 g și pentru soia de 2 000 g. Pentru alte s meiul, ovăzul, orezul, secara, grâul și semințele de rapiță, din g corespunde unui număr de peste 10 000 de semințe/boabe. (*2) În cazul în care dimensiunea eşantionului agregat este se litri (a se vedea notele de subsol de la punctul 6), se poate pre mică de eşantion final, cu condiția ca aceasta să fie descrisă ș eşantionare. (*3) În cazul eşantionării leguminoaselor, boabelor de cereal determinarea reziduurilor de pesticide, dimensiunea minimă a	Furaje solide	500	Furaje lichide sau semilichide	500	
Furaje solide	500 g (*1)									
Furaje lichide sau semilichide	500 ml (*1)									
Furaje solide	500									
Furaje lichide sau semilichide	500									

(*3) În cazul eşantionării leguminoaselor, boabelor de cereale şi determinarea reziduurilor de pesticide, dimensiunea minimă a eşantionului este de 1 kg în conformitate cu dispoziţiile Directivei 2002/63/CE a Comisiei stabilire a metodelor comunitare de prelevare de probe pentru controlul de pesticide de pe şi din produsele de origine vegetală şi animală Directivei 79/700/CEE (JO L 187, 16.7.2002, p. 30). (*4) În cazul examinării prin inspecţie vizuală sau prin microscopie final pentru examinare este de 1 kg.	conformitate cu dispoziţiile Directivei 2002/63/CE a Comisiei din 11 iulie 2002 de stabilire a metodelor comunitare de prelevare de probe pentru controlul oficial al reziduurilor de pesticide de pe şi din produsele de origine vegetală şi animală şi de abrogare a Directivei 79/700/CEE (JO L 187, 16.7.2002, p. 30). (*4) În cazul examinării prin inspecţie vizuală sau prin microscopie, cantitatea eşantionului final pentru examinare este de 1 kg.	
8. METODA DE EŞANTIONARE PENTRU LOTURI FOARTE MARI SAU LOTURI DEPOZITATE SAU TRANSPORTATE ÎNTR-UN MOD CARE NU PERMITE EŞANTIONAREA ÎNTREGULUI LOT 8.1. Principii generale În cazul în care modul de transport sau de depozitare a unui lot nu permite prelevarea de eşantioane elementare din întregul lot, eşantionarea unor astfel de loturi trebuie, de preferinţă, să fie efectuată atunci când lotul se află în flux. În cazul antrepozitelor mari destinate să stocheze furajele, operatorii trebuie să fie încurajaţi să instaleze echipamente în antrepozit care să permită eşantionarea (automată) a întregului lot stocat. În cazul aplicării procedurilor de eşantionare prevăzute la prezentul punct, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul său este informat cu privire la procedura de eşantionare. În cazul în care procedura de eşantionare este pusă sub semnul întrebării de către operatorul din sectorul hranei pentru animale sau de către reprezentantul acestuia, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul acestuia va permite autorităţii competente să preleveze eşantioane din întregul lot pe cheltuiala sa. 8.2. Loturile mari transportate pe cale navală	8. METODA DE EŞANTIONARE PENTRU LOTURI FOARTE MARI SAU LOTURI DEPOZITATE SAU TRANSPORTATE ÎNTR-UN MOD CARE NU PERMITE EŞANTIONAREA ÎNTREGULUI LOT 8.1. Principii generale În cazul în care modul de transport sau de depozitare a unui lot nu permite prelevarea de eşantioane elementare din întregul lot, eşantionarea unor astfel de loturi trebuie, de preferinţă, să fie efectuată atunci când lotul se află în flux. În cazul antrepozitelor mari destinate să stocheze furajele, operatorii trebuie să fie încurajaţi să instaleze echipamente în antrepozit care să permită eşantionarea (automată) a întregului lot stocat. În cazul aplicării procedurilor de eşantionare prevăzute la prezentul punct, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul său este informat cu privire la procedura de eşantionare. În cazul în care procedura de eşantionare este pusă sub semnul întrebării de către operatorul din sectorul hranei pentru animale sau de către reprezentantul acestuia, operatorul din sectorul hranei pentru animale sau reprezentantul acestuia va permite autorităţii competente să preleveze eşantioane din întregul lot pe cheltuiala sa. 8.2. Loturile mari transportate pe cale navală	

8.2.1. Eșantionarea dinamică a loturilor mari transportate pe cale navală Eșantionarea loturilor mari în nave se efectuează de preferință în timp ce produsul este în flux (eșantionare dinamică). Eșantionarea se face per stivă (entitate care poate fi separată fizic). Stivele sunt, totuși, golite parțial una după alta, astfel încât separarea fizică inițială nu mai există după transferul în instalațiile de depozitare. Prin urmare, eșantionarea poate fi efectuată în funcție de separarea fizică inițială sau în funcție de separarea după transferul în instalațiile de depozitare. Descărcarea unei nave poate dura câteva zile. În mod normal, eșantionarea trebuie să fie efectuată la intervale de timp regulate pe întreaga durată a descărcării. Cu toate acestea, nu este întotdeauna posibil sau adecvat pentru un inspector oficial să fie prezent pentru eșantionare pe parcursul întregii operațiuni de descărcare. Prin urmare, se permite eșantionarea unei părți (lot eșantionat) din întregul lot. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. Chiar dacă eșantionul oficial este prelevat automat, prezența unui inspector este necesară. Cu toate acestea, în cazul în care se efectuează o prelevare automată cu parametri prestabiliți care nu pot fi schimbați în cursul eșantionării și eșantioanele elementare sunt colectate într-un recipient închis, împiedicând orice posibilă fraudă, prezența unui inspector este necesară numai la începutul eșantionării, de fiecare dată când recipientul	8.2.1. Eșantionarea dinamică a loturilor mari transportate pe cale navală Eșantionarea loturilor mari în nave se efectuează de preferință în timp ce produsul este în flux (eșantionare dinamică). Eșantionarea se face per stivă (entitate care poate fi separată fizic). Stivele sunt, totuși, golite parțial una după alta, astfel încât separarea fizică inițială nu mai există după transferul în instalațiile de depozitare. Prin urmare, eșantionarea poate fi efectuată în funcție de separarea fizică inițială sau în funcție de separarea după transferul în instalațiile de depozitare. Descărcarea unei nave poate dura câteva zile. În mod normal, eșantionarea trebuie să fie efectuată la intervale de timp regulate pe întreaga durată a descărcării. Cu toate acestea, nu este întotdeauna posibil sau adecvat pentru un inspector oficial să fie prezent pentru eșantionare pe parcursul întregii operațiuni de descărcare. Prin urmare, se permite eșantionarea unei părți (lot eșantionat) din întregul lot. Numărul de eșantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eșantionat. În cazul eșantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. Chiar dacă eșantionul oficial este prelevat automat, prezența unui inspector este necesară. Cu toate acestea, în cazul în care se efectuează o prelevare automată cu parametri prestabiliți care nu pot fi schimbați în cursul eșantionării și eșantioanele elementare sunt colectate într-un recipient închis, împiedicând orice posibilă fraudă, prezența unui inspector este necesară numai la începutul eșantionării, de fiecare dată		

în care se află eşantioanele trebuie să fie schimbat şi la sfârşitul eşantionării. 8.2.2. Eşantionarea loturilor transportate pe cale navală prin eşantionare statică În cazul în care eşantionarea se efectuează în mod static, trebuie aplicată aceeaşi procedură ca şi cea prevăzută pentru spaţiile de depozitare (silozuri) accesibile din partea de sus (a se vedea punctul 8.4.1). Eşantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă (de sus) din lot/stivă. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părţi dintr-un lot de furaje din aceeaşi clasă sau având aceeaşi descriere şi în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerinţele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepţia cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerinţele UE. 8.3. Eşantionarea loturilor mari depozitate în antrepozite Eşantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părţi dintr-un lot de furaje din aceeaşi clasă sau având aceeaşi descriere şi în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerinţele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepţia cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerinţele UE. 8.4. Prelevarea de eşantioane din spaţii de depozitare (silozuri) 8.4.1. Prelevarea de eşantioane din silozuri (uşor) accesibile din partea de sus	când recipientul în care se află eşantioanele trebuie să fie schimbat şi la sfârşitul eşantionării. 8.2.2. Eşantionarea loturilor transportate pe cale navală prin eşantionare statică În cazul în care eşantionarea se efectuează în mod static, trebuie aplicată aceeaşi procedură ca şi cea prevăzută pentru spaţiile de depozitare (silozuri) accesibile din partea de sus (a se vedea punctul 8.4.1). Eşantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă (de sus) din lot/stivă. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părţi dintr-un lot de furaje din aceeaşi clasă sau având aceeaşi descriere şi în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerinţele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepţia cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerinţele UE. 8.3. Eşantionarea loturilor mari depozitate în antrepozite Eşantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părţi dintr-un lot de furaje din aceeaşi clasă sau având aceeaşi descriere şi în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerinţele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepţia cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerinţele UE. 8.4. Prelevarea de eşantioane din spaţii de depozitare (silozuri) 8.4.1. Prelevarea de eşantioane din silozuri (uşor) accesibile din partea de sus	

Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. 8.4.2. Prelevarea de eşantioane din silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) 8.4.2.1. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea > 100 de tone Furajele depozitate în astfel de silozuri nu pot fi eşantionate în mod static. Prin urmare, în cazul în care furajele din siloz trebuie să fie eşantionate și nu există nicio posibilitate de a deplasa lotul, trebuie să se ajungă la un acord cu operatorul conform căruia acesta trebuie să informeze inspectorul cu privire la momentul în care silozul va fi descărcat pentru a permite eşantionarea atunci când furajul este în flux. 8.4.2.2. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea < 100 de tone Procedura de eşantionare implică introducerea într-un recipient a unei cantități de 50-100 kg și prelevarea eşantionului din aceasta. Dimensiunea eşantionului agregat corespunde cu întregul lot, iar numărul de eşantioane elementare este legat de cantitatea din siloz introdusă într-un recipient pentru eşantionare. În cazul eşantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma	Eșantionarea trebuie să se efectueze pe partea accesibilă a lotului. Numărul de eşantioane elementare este stabilit luând în considerare dimensiunea lotului eşantionat. În cazul eşantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. 8.4.2. Prelevarea de eşantioane din silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) 8.4.2.1. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea > 100 de tone Furajele depozitate în astfel de silozuri nu pot fi eşantionate în mod static. Prin urmare, în cazul în care furajele din siloz trebuie să fie eşantionate și nu există nicio posibilitate de a deplasa lotul, trebuie să se ajungă la un acord cu operatorul conform căruia acesta trebuie să informeze inspectorul cu privire la momentul în care silozul va fi descărcat pentru a permite eşantionarea atunci când furajul este în flux. 8.4.2.2. Silozuri care nu sunt accesibile din partea de sus (silozuri închise) cu dimensiunea < 100 de tone Procedura de eşantionare implică introducerea într-un recipient a unei cantități de 50-100 kg și prelevarea eşantionului din aceasta. Dimensiunea eşantionului agregat corespunde cu întregul lot, iar numărul de eşantioane elementare este legat de cantitatea din siloz introdusă într-un recipient pentru eşantionare. În cazul eşantionării unei părți dintr-un lot de furaje din aceeași clasă sau având aceeași descriere și în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu		

unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. 8.5. Eșantionarea furajelor vrac în recipiente mari închise Adesea, astfel de loturi pot fi eșantionate numai atunci când sunt descărcate. În anumite cazuri nu este posibil să se descarce loturile la punctul de import sau de control și, prin urmare, eșantionarea ar trebui să aibă loc atunci când aceste recipiente sunt descărcate. 9. INSTRUCȚIUNI PENTRU PRELEVAREA, PREPARAREA ȘI AMBALAREA EȘANTIOANELOR 9.1. Generalități Eșantioanele trebuie prelevate și preparate fără întârzieri inutile, luând în considerare precauțiile necesare pentru a garanta că produsul nu este nici modificat, nici contaminat. Instrumentele, suprafețele de lucru și recipientele destinate colectării de eșantioane trebuie să fie curate și uscate. 9.2. Eșantioane elementare Eșantioanele elementare trebuie prelevate în mod aleatoriu și distribuite uniform din întregul lot eșantionat, iar dimensiunile lor trebuie să fie aproximativ egale. Dimensiunea eșantionului elementar este de cel puțin 100 de grame sau 25 de grame în cazul furajelor grosiere sau al nutrețului cu o densitate specifică redusă. În cazul în care, în conformitate cu normele pentru procedura de eșantionare stabilite la punctul 8, trebuie prelevate mai puțin de 40 de eșantioane elementare, dimensiunea eșantioanelor elementare se determină în funcție de dimensiunea necesară a eșantionului agregat (a se vedea punctul 6). În cazul eșantionării loturilor de dimensiuni reduse de furaje ambalate în cazul cărora, conform cerințelor cantitative, trebuie prelevat un număr limitat de eșantioane elementare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unei unități originale al cărei conținut nu depășește 1 kg sau un litru.	excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate, nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE. 8.5. Eșantionarea furajelor vrac în recipiente mari închise Adesea, astfel de loturi pot fi eșantionate numai atunci când sunt descărcate. În anumite cazuri nu este posibil să se descarce loturile la punctul de import sau de control și, prin urmare, eșantionarea ar trebui să aibă loc atunci când aceste recipiente sunt descărcate. 9. INSTRUCȚIUNI PENTRU PRELEVAREA, PREPARAREA ȘI AMBALAREA EȘANTIOANELOR 9.1. Generalități Eșantioanele trebuie prelevate și preparate fără întârzieri inutile, luând în considerare precauțiile necesare pentru a garanta că produsul nu este nici modificat, nici contaminat. Instrumentele, suprafețele de lucru și recipientele destinate colectării de eșantioane trebuie să fie curate și uscate. 9.2. Eșantioane elementare Eșantioanele elementare trebuie prelevate în mod aleatoriu și distribuite uniform din întregul lot eșantionat, iar dimensiunile lor trebuie să fie aproximativ egale. Dimensiunea eșantionului elementar este de cel puțin 100 de grame sau 25 de grame în cazul furajelor grosiere sau al nutrețului cu o densitate specifică redusă. În cazul în care, în conformitate cu normele pentru procedura de eșantionare stabilite la punctul 8, trebuie prelevate mai puțin de 40 de eșantioane elementare, dimensiunea eșantioanelor elementare se determină în funcție de dimensiunea necesară a eșantionului agregat (a se vedea punctul 6). În cazul eșantionării loturilor de dimensiuni reduse de furaje ambalate în cazul cărora, conform cerințelor cantitative, trebuie prelevat un număr limitat de eșantioane elementare, un eșantion elementar este reprezentat de conținutul unei	

În cazul eşantionării furajelor ambalate compuse din unități mici (de exemplu, < 250 g), dimensiunea eşantionului elementar depinde de dimensiunea unității. În cazul eşantioanelor din vânzările la distanță, dimensiunea eşantionului elementar depinde de dimensiunea unității și poate conține, de asemenea, mai puțin de 100 g sau 100 ml în cazuri individuale. 9.2.1. Furaje vrac După caz, eşantionarea poate fi efectuată atunci când lotul eşantionat este în flux (încărcare sau descărcare). 9.2.2. Furaje ambalate După selectarea numărului necesar de unități pentru eşantionare, conform indicațiilor de la punctul 5, o parte a conținutului fiecărei unități se îndepărtează folosind o sondă sau o lopată. Dacă este necesar, eşantioanele se prelevează după ce unitățile au fost golite separat. 9.2.3. Furaje lichide sau semilichide, omogene sau omogenizabile După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, conținutul se omogenizează, dacă este necesar, și se prelevează o cantitate din fiecare unitate. Eşantioanele elementare pot fi prelevate la descărcarea conținutului. 9.2.4. Furaje lichide sau semilichide, neomogenizabile După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, se prelevează eşantioane de la diferite niveluri. Eşantioanele se pot preleva și în timpul descărcării conținutului, dar primele fracțiuni se îndepărtează. În oricare dintre cazuri, volumul total prelevat nu trebuie să fie mai mic de 10 litri. 9.2.5. Blocuri de furaje și brichete minerale	unități originale al cărei conținut nu depășește 1 kg sau un litru. În cazul eşantionării furajelor ambalate compuse din unități mici (de exemplu, < 250 g), dimensiunea eşantionului elementar depinde de dimensiunea unității. În cazul eşantioanelor din vânzările la distanță, dimensiunea eşantionului elementar depinde de dimensiunea unității și poate conține, de asemenea, mai puțin de 100 g sau 100 ml în cazuri individuale. 9.2.1. Furaje vrac După caz, eşantionarea poate fi efectuată atunci când lotul eşantionat este în flux (încărcare sau descărcare). 9.2.2. Furaje ambalate După selectarea numărului necesar de unități pentru eşantionare, conform indicațiilor de la punctul 5, o parte a conținutului fiecărei unități se îndepărtează folosind o sondă sau o lopată. Dacă este necesar, eşantioanele se prelevează după ce unitățile au fost golite separat. 9.2.3. Furaje lichide sau semilichide, omogene sau omogenizabile După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, conținutul se omogenizează, dacă este necesar, și se prelevează o cantitate din fiecare unitate. Eşantioanele elementare pot fi prelevate la descărcarea conținutului. 9.2.4. Furaje lichide sau semilichide, neomogenizabile După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de unități, în conformitate cu indicațiile de la punctul 5, se prelevează eşantioane de la diferite niveluri. Eşantioanele se pot preleva și în timpul descărcării conținutului, dar primele fracțiuni se îndepărtează. În oricare dintre cazuri, volumul total prelevat nu trebuie să fie mai mic de 10 litri.	

După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de blocuri sau brichete, conform indicațiilor de la punctul 5, se prelevează o parte din fiecare bloc sau brichetă. În cazul în care există suspiciuni legate de un bloc sau de o brichetă neomogen(ă), întregul bloc sau întreaga brichetă poate fi considerat(ă) ca eşantion. În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete. 9.3. Prepararea eşantioanelor agregat Eşantioanele elementare se amestecă pentru a forma un singur eşantion agregat. 9.4. Prepararea eşantioanelor finale Materialul din eşantionul agregat se amestecă cu grijă (5). Fiecare eşantion este introdus într-un recipient corespunzător. Se iau toate precauțiile necesare pentru evitarea oricărei modificări de compoziție a eşantionului, a contaminării sau a falsificării, care ar putea avea loc în timpul transportării sau depozitării. 9.4.1. Substanțe distribuite uniform În cazul controlului constituenților sau substanțelor uniform distribuite în întregul furaj, eşantionul agregat poate fi redus în mod reprezentativ la cel puțin 2,0 kg sau 2,0 l (eşantion redus) (6), de preferință prin utilizarea fie a unui separator mecanic, fie a unui separator automat. Pentru controlul prezenței de reziduuri de pesticide în leguminoase, boabe de cereale și fructe nucifere, dimensiunea minimă a eşantionului redus este de 3 kg. În cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator sau separatorul nu este disponibil, eşantionul poate fi redus prin metoda sferturilor. Din eşantionul agregat sau din eşantioanele reduse se prelevează eşantioanele finale (pentru control, apărare și, eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.	9.2.5. Blocuri de furaje și brichete minerale După selectarea pentru eşantionare a numărului necesar de blocuri sau brichete, conform indicațiilor de la punctul 5, se prelevează o parte din fiecare bloc sau brichetă. În cazul în care există suspiciuni legate de un bloc sau de o brichetă neomogen(ă), întregul bloc sau întreaga brichetă poate fi considerat(ă) ca eşantion. În cazul blocurilor sau brichetelor care nu cântăresc mai mult de 1 kg fiecare, un eşantion elementar este reprezentat de conținutul unui bloc sau al unei brichete. 9.3. Prepararea eşantioanelor agregat Eşantioanele elementare se amestecă pentru a forma un singur eşantion agregat. 9.4. Prepararea eşantioanelor finale Materialul din eşantionul agregat se amestecă cu grijă (5). Fiecare eşantion este introdus într-un recipient corespunzător. Se iau toate precauțiile necesare pentru evitarea oricărei modificări de compoziție a eşantionului, a contaminării sau a falsificării, care ar putea avea loc în timpul transportării sau depozitării. 9.4.1. Substanțe distribuite uniform În cazul controlului constituenților sau substanțelor uniform distribuite în întregul furaj, eşantionul agregat poate fi redus în mod reprezentativ la cel puțin 2,0 kg sau 2,0 l (eşantion redus) (6), de preferință prin utilizarea fie a unui separator mecanic, fie a unui separator automat. Pentru controlul prezenței de reziduuri de pesticide în leguminoase, boabe de cereale și fructe nucifere, dimensiunea minimă a eşantionului redus este de 3 kg. În cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator sau separatorul nu este disponibil, eşantionul poate fi redus prin metoda sferturilor. Din eşantionul agregat sau din eşantioanele reduse se prelevează eşantioanele finale (pentru control, apărare și,		

9.4.2. Substanțe distribuite neuniform

În cazul controlului constituenților, inclusiv materialul modificat genetic sau substanțele care ar putea fi distribuite neuniform în furaje, eșantionul agregat trebuie să fie:

(i) complet omogenizat. Apoi, din eșantionul agregat omogenizat se prelevează eșantioanele finale (pentru control, apărare și, eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7; sau

(ii) redus la cel puțin 2 kg sau 2 litri (⁷) prin utilizarea unui separator mecanic sau automat. Numai în cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator, eșantionul poate, dacă este necesar, să fie redus prin metoda sferturilor. Pentru controlul prezenței materialului modificat genetic în temeiul Regulamentului (UE) nr. 619/2011, eșantionul redus trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe pentru a permite obținerea eșantioanelor finale de cel puțin 10 000 de semințe pentru asigurarea respectării legislației, apărare și, eventual, referință [a se vedea nota de subsol (**) de la punctul 6 și nota de subsol (*) de la punctul 7].

Din eșantionul redus se prelevează eșantioanele finale de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.

9.5. Ambalarea eșantioanelor

Recipientele sau ambalajele se sigilează și se etichetează astfel încât să nu poată fi deschise fără a deteriora sigiliul. Eticheta completă se încorporează în sigiliu. În mod alternativ, eșantionul poate fi pus într-un recipient care poate fi închis astfel încât să nu poată fi deschis fără a deteriora în mod ireversibil recipientul, evitând reutilizarea recipientului.

9.6. Expedierea eșantioanelor către laborator

Eșantionul trebuie să fie trimis fără întârzieri inutile la laboratorul analitic desemnat, împreună cu informațiile necesare laborantului.

eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.

9.4.2. Substanțe distribuite neuniform

În cazul controlului constituenților, inclusiv materialul modificat genetic sau substanțele care ar putea fi distribuite neuniform în furaje, eșantionul agregat trebuie să fie:

(i) complet omogenizat. Apoi, din eșantionul agregat omogenizat se prelevează eșantioanele finale (pentru control, apărare și, eventual, referință) de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7; sau

(ii) redus la cel puțin 2 kg sau 2 litri (7) prin utilizarea unui separator mecanic sau automat. Numai în cazul în care natura furajului nu permite utilizarea unui separator, eșantionul poate, dacă este necesar, să fie redus prin metoda sferturilor. Pentru controlul prezenței materialului modificat genetic, eșantionul redus trebuie să conțină cel puțin 35 000 de semințe/boabe pentru a permite obținerea eșantioanelor finale de cel puțin 10 000 de semințe pentru asigurarea respectării legislației, apărare și, eventual, referință [a se vedea nota de subsol (**) de la punctul 6 și nota de subsol (*) de la punctul 7].

Din eșantionul redus se prelevează eșantioanele finale de o dimensiune aproximativ egală, în conformitate cu cerințele cantitative de la punctul 7.

9.5. Ambalarea eșantioanelor

Recipientele sau ambalajele se sigilează și se etichetează astfel încât să nu poată fi deschise fără a deteriora sigiliul. Eticheta completă se încorporează în sigiliu. În mod alternativ, eșantionul poate fi pus într-un recipient care poate fi închis astfel încât să nu poată fi deschis fără a deteriora în mod ireversibil recipientul, evitând reutilizarea recipientului.

9.6. Expedierea eșantioanelor către laborator

10. PROCESUL-VERBAL DE EȘANTIONARE

Pentru fiecare eșantion se întocmește un proces-verbal, care permite identificarea fără ambiguități a lotului eșantionat și a dimensiunii acestuia.

Procesul-verbal trebuie să menționeze, de asemenea, orice abatere de la procedura de eșantionare, astfel cum se prevede în prezentul regulament.

Procesul-verbal trebuie pus atât la dispoziția laboratorului de control oficial, cât și la dispoziția operatorului din sectorul hranei pentru animale și/sau a laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale.

11. EȘANTION DIN VÂNZARE LA DISTANȚĂ

— Pentru un eșantion din vânzare la distanță, furajul se solicită operatorului din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță. În acest caz, atunci când solicită furajul, autoritatea competentă nu trebuie să se identifice cu o identitate oficială operatorului din sectorul hranei pentru animale și poate utiliza o identitate falsă.

— Eșantionul agregat și eșantioanele finale ale eșantionului din vânzarea la distanță trebuie prelevate imediat după primirea transportului de către persoane autorizate în acest scop. Pentru generarea eșantionului agregat, trebuie prelevat un număr adecvat de eșantioane elementare aleatorii și uniform distribuite din cantitatea totală obținută și amestecate/omogenizate cu grijă, în conformitate, pe cât posibil, cu principiile stabilite la punctul 5 și la punctele 9.2 și 9.3. În cazul în care furajul este ambalat în unități individuale, trebuie să se obțină cel puțin 4 unități din care trebuie prelevat cel puțin un eșantion elementar. În cazul în care se demonstrează, de la caz la caz, că unitățile obținute provin din loturi diferite, numărul de unități care trebuie eșantionate trebuie redus și limitat la unitățile care provin din același lot. În cazul analizării eșantionului din vânzare la distanță pentru constituenți sau substanțe care sunt distribuite neuniform în furaje, numărul de eșantioane

Eșantionul trebuie să fie trimis fără întârzieri inutile la laboratorul analitic desemnat, împreună cu informațiile necesare laborantului.

10. PROCESUL-VERBAL DE EȘANTIONARE

Pentru fiecare eșantion se întocmește un proces-verbal, care permite identificarea fără ambiguități a lotului eșantionat și a dimensiunii acestuia.

Procesul-verbal trebuie să menționeze, de asemenea, orice abatere de la procedura de eșantionare, astfel cum se prevede în prezenta anexă.

Procesul-verbal trebuie pus atât la dispoziția laboratorului de control oficial, cât și la dispoziția operatorului din sectorul hranei pentru animale și/sau a laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale.

11. EȘANTION DIN VÂNZARE LA DISTANȚĂ

— Pentru un eșantion din vânzare la distanță, furajul se solicită operatorului din sectorul hranei pentru animale prin mijloace de comunicare la distanță. În acest caz, atunci când solicită furajul, autoritatea competentă nu trebuie să se identifice cu o identitate oficială operatorului din sectorul hranei pentru animale și poate utiliza o identitate falsă.

— Eșantionul agregat și eșantioanele finale ale eșantionului din vânzarea la distanță trebuie prelevate imediat după primirea transportului de către persoane autorizate în acest scop. Pentru generarea eșantionului agregat, trebuie prelevat un număr adecvat de eșantioane elementare aleatorii și uniform distribuite din cantitatea totală obținută și amestecate/omogenizate cu grijă, în conformitate, pe cât posibil, cu principiile stabilite la punctul 5 și la punctele 9.2 și 9.3. În cazul în care furajul este ambalat în unități individuale, trebuie să se obțină cel puțin 4 unități din care trebuie prelevat cel puțin un eșantion elementar. În cazul în care se demonstrează, de la caz la caz, că unitățile obținute provin din loturi diferite, numărul de unități care trebuie

elementare trebuie să fie de cel puțin 2,5 ori mai mare decât cel al eşantioanelor analizate pentru substanțe distribuite uniform în furaj. Din eşantionul agregat se prelevează apoi eşantioanele finale corespunzătoare (pentru control, pentru apărare și, eventual, pentru referință) în conformitate, în măsura posibilului, cu principiile prevăzute la punctul 9.4, iar procesul-verbal de eşantionare indică faptul că eşantionul este un eşantion din vânzare la distanță. Autoritatea competentă informează imediat operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare. Operatorul din sectorul hranei pentru animale este, de asemenea, informat că un eşantion (pentru apărare) este păstrat, atunci când este posibil, la dispoziția sa de către autoritatea competentă, într-un loc specificat, în scopuri de apărare, sau este trimis operatorului din sectorul hranei pentru animale sau laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale în conformitate cu normele naționale în vigoare. În cazul în care eşantionul este trimis direct laboratorului oficial, eşantionul final trebuie preparat și sigilat în laborator de către persoane autorizate în acest scop sau în prezența unor persoane autorizate în acest scop. Procesul-verbal de eşantionare a eşantionului din vânzarea la distanță trebuie trimis imediat după formarea eşantioanelor finale autorității competente, care informează operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare. Se consideră că respectiva cantitate furnizată autorității competente de către operatorul din sectorul hranei pentru animale reprezintă o parte dintr-un lot de hrană pentru animale din aceeași clasă sau cu aceeași descriere. În conformitate cu articolul 15 din Regulamentul (CE) nr. 178/2002 al Parlamentului European și al Consiliului (8), în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele UE, se presupune, și în cazul unui eşantion din vânzare la	eşantionate trebuie redus și limitat la unitățile care provin din același lot. În cazul analizării eşantionului din vânzare la distanță pentru constituenți sau substanțe care sunt distribuite neuniform în furaje, numărul de eşantioane elementare trebuie să fie de cel puțin 2,5 ori mai mare decât cel al eşantioanelor analizate pentru substanțe distribuite uniform în furaj. Din eşantionul agregat se prelevează apoi eşantioanele finale corespunzătoare (pentru control, pentru apărare și, eventual, pentru referință) în conformitate, în măsura posibilului, cu principiile prevăzute la punctul 9.4, iar procesul-verbal de eşantionare indică faptul că eşantionul este un eşantion din vânzare la distanță. Autoritatea competentă informează imediat operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare. Operatorul din sectorul hranei pentru animale este, de asemenea, informat că un eşantion (pentru apărare) este păstrat, atunci când este posibil, la dispoziția sa de către autoritatea competentă, într-un loc specificat, în scopuri de apărare, sau este trimis operatorului din sectorul hranei pentru animale sau laboratorului desemnat de operatorul din sectorul hranei pentru animale în conformitate cu normele naționale în vigoare. În cazul în care eşantionul este trimis direct laboratorului oficial, eşantionul final trebuie preparat și sigilat în laborator de către persoane autorizate în acest scop sau în prezența unor persoane autorizate în acest scop. Procesul-verbal de eşantionare a eşantionului din vânzarea la distanță trebuie trimis imediat după formarea eşantioanelor finale autorității competente, care informează operatorul din sectorul hranei pentru animale cu privire la eşantionare. Se consideră că respectiva cantitate furnizată autorității competente de către operatorul din sectorul hranei pentru animale reprezintă o parte dintr-un lot de hrană pentru animale din aceeași clasă sau cu aceeași descriere. În		

distanță, că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate (după caz, în cadrul unei inspecții la fața locului), se constată că nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele UE.	conformitate cu art.9 la Legea nr.306/2028 privind siguranța alimentelor, în cazul în care acea parte a lotului este identificată ca nesatisfăcând cerințele de siguranță, se presupune, și în cazul unui eșantion din vânzare la distanță, că rezultatele sunt valabile pentru toate furajele din acel lot, cu excepția cazului în care, în urma unei evaluări detaliate (după caz, în cadrul unei inspecții la fața locului), se constată că nu există nicio dovadă că restul lotului nu satisface cerințele de siguranță.		

ANEXA II DISPOZIȚII GENERALE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ A FURAJELOR A. PREPARAREA EȘANTIOANELOR PENTRU ANALIZĂ 1. Obiectiv Procedurile descrise în prezenta anexă se referă la prepararea pentru analiză a eșantioanelor trimise laboratoarelor de control după eșantionare conform dispozițiilor prevăzute în anexa I. Eșantioanele de laborator trebuie pregătite astfel încât cantitățile prelevate, astfel cum se prevede în metodele de analiză, să fie omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale. În plus față de procedurile descrise în prezenta anexă, trebuie respectate orientările pentru prepararea eșantioanelor prevăzute în EN ISO 6498. 2. Măsuri de precauție Procedura de preparare a eșantioanelor care trebuie urmată este în funcție de metodele de analiză care trebuie utilizate și de constituenții sau substanțele care trebuie controlate. De aceea, este extrem de important ca procedura de preparare a eșantioanelor urmată să fie adecvată pentru metoda de analiză utilizată și pentru constituenții sau substanțele care trebuie controlate. Toate operațiunile necesare trebuie să se efectueze astfel încât să se evite, pe cât posibil, contaminarea eșantionului și modificarea compoziției acestuia. Măcinarea, amestecarea și cernerea se efectuează fără întârziere în condițiile unei expuneri minime a eșantionului la aer și la lumină. Nu se utilizează rășnițe sau aparate de măcinat care ar putea cauza încălzirea semnificativă a eșantionului. Se recomandă ca furajele foarte sensibile la căldură să fie măcinate manual. Trebuie, de asemenea, să se asigure că aparatul în sine nu constituie o sursă de contaminare.	Anexă nr.2 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor DISPOZIȚII GENERALE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ A FURAJELOR A. PREPARAREA EȘANTIOANELOR PENTRU ANALIZĂ 1. Obiectiv Procedurile descrise în prezenta anexă se referă la prepararea pentru analiză a eșantioanelor trimise laboratoarelor de control după eșantionare conform dispozițiilor prevăzute în anexa nr. 1. Eșantioanele de laborator trebuie pregătite astfel încât cantitățile prelevate, astfel cum se prevede în metodele de analiză, să fie omogene și reprezentative pentru eșantioanele finale. În plus față de procedurile descrise în prezenta anexă, trebuie respectate orientările pentru prepararea eșantioanelor prevăzute în SM EN ISO 6498:2016. 2. Măsuri de precauție Procedura de preparare a eșantioanelor care trebuie urmată este în funcție de metodele de analiză care trebuie utilizate și de constituenții sau substanțele care trebuie controlate. De aceea, este extrem de important ca procedura de preparare a eșantioanelor urmată să fie adecvată pentru metoda de analiză utilizată și pentru constituenții sau substanțele care trebuie controlate. Toate operațiunile necesare trebuie să se efectueze astfel încât să se evite, pe cât posibil, contaminarea eșantionului și modificarea compoziției acestuia.	Compatibil	

Omogenizarea eșantionului prin prepararea unei suspensii prin amestecare cu apă cu ajutorul unui mixer cu forfecare înaltă s-a dovedit a furniza, în anumite cazuri, subeșantioane mai omogene decât omogenizarea/măcinarea uscată, în special în cazul substanțelor chimice distribuite eterogen. Cu toate acestea, omogenizarea printr-o măcinare uscată suficientă ar putea oferi subeșantioane omogene.

În anumite cazuri, cum ar fi pentru determinarea cornului secarei, a impurităților botanice nocive etc., omogenizarea eșantionului nu poate fi realizată prin măcinare, ci prin amestecarea suficientă a eșantionului.

Dacă prepararea nu poate fi efectuată fără modificări semnificative ale conținutului de umiditate al eșantionului, se determină conținutul de umiditate înainte și după preparare, în conformitate cu metoda menționată în partea A din anexa III.

3. Procedura

3.1. Procedura generală

Alicota de test este prelevată din eșantionul final omogenizat. Formarea unui con și selectarea de sferturi nu sunt recomandate deoarece ar putea să se formeze alicote de test care să dea naștere la erori de separare mari.

3.1.1. Furaje care pot fi măcinate ca atare

— Se amestecă eșantionul final și se introduce într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă din nou pentru a asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantității pentru analiză (alicota de test).

3.1.2. Furaje care pot fi măcinate după uscare

— Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, eșantionul final se deshidratează astfel încât umiditatea sa să se reducă la 8-12 %, în conformitate cu procedura de preuscare descrisă la punctul 4.3 din metoda de determinare a umidității menționată în partea A din anexa III. Se procedează apoi în conformitate cu indicațiile de la punctul 3.1.1.

3.1.3. Furaje lichide sau semilichide

Măcinarea, amestecarea și cernerea se efectuează fără întârziere în condițiile unei expuneri minime a eșantionului la aer și la lumină. Nu se utilizează râșnițe sau aparate de măcinat care ar putea cauza încălzirea semnificativă a eșantionului.

Se recomandă ca furajele foarte sensibile la căldură să fie măcinate manual. Trebuie, de asemenea, să se asigure că aparatul în sine nu constituie o sursă de contaminare.

Omogenizarea eșantionului prin prepararea unei suspensii prin amestecare cu apă cu ajutorul unui mixer cu forfecare înaltă s-a dovedit a furniza, în anumite cazuri, subeșantioane mai omogene decât omogenizarea/măcinarea uscată, în special în cazul substanțelor chimice distribuite eterogen. Cu toate acestea, omogenizarea printr-o măcinare uscată suficientă ar putea oferi subeșantioane omogene.

În anumite cazuri, cum ar fi pentru determinarea cornului secarei, a impurităților botanice nocive etc., omogenizarea eșantionului nu poate fi realizată prin măcinare, ci prin amestecarea suficientă a eșantionului.

Dacă prepararea nu poate fi efectuată fără modificări semnificative ale conținutului de umiditate al eșantionului, se determină conținutul de umiditate înainte și după preparare, în conformitate cu metoda menționată în partea A din anexa nr.3.

3. Procedura

3.1. Procedura generală

Alicota de test este prelevată din eșantionul final omogenizat. Formarea unui con și selectarea de sferturi nu sunt recomandate deoarece ar putea să se formeze alicote de test care să dea naștere la erori de separare mari.

3.1.1. Furaje care pot fi măcinate ca atare

— Se amestecă eșantionul final și se introduce într-un recipient adecvat, curat și uscat, dotat cu un capac ermetic. Se amestecă din nou pentru a asigura o omogenizare

— Se recoltează eşantionul final într-un recipient adecvat, curat şi uscat, dotat cu un sistem de închidere ermetică. Se amestecă cu grijă pentru a se asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantităţii pentru analiză (alicota de test). 3.1.4. Alte furaje — Eşantioanele finale care nu pot fi preparate conform uneia dintre procedurile indicate anterior se tratează prin orice altă procedură prin care se asigură că cantităţile prelevate pentru analiză (alicota de test) sunt omogene şi reprezentative pentru eşantioanele finale. 3.2. Proceduri specifice în cazul examinării prin inspecţie vizuală sau la microscop sau în cazurile în care întregul eşantion agregat se omogenizează — În cazul unei examinări prin inspecţie vizuală (fără a recurge la microscop), întregul eşantion agregat sau final se utilizează pentru examinare. — În cazul unei examinări microscopice, laboratorul poate reduce eşantionul agregat sau poate efectua o reducere ulterioară a eşantionului redus. Eşantioanele finale pentru apărare şi, eventual, pentru referinţă sunt prelevate în urma unei proceduri echivalente cu procedura urmată pentru eşantionul final pentru asigurarea respectării legislaţiei. — În cazul în care întregul eşantion agregat este omogenizat, eşantioanele finale sunt prelevate din eşantionul agregat omogenizat. — Pentru determinarea cornului secarei şi a impurităţilor botanice nocive, eşantionul final trebuie împărţit în două subeşantioane cu o greutate egală de aproximativ 500 de grame. Se examinează un subeşantion. În cazul în care rezultatul subeşantioanelor este mai mic sau egal cu 50 % (prag analitic) din nivelul maxim, eşantionul este conform cu nivelul maxim. Dacă rezultatul este mai mare de 50 % din nivelul maxim, este necesar să se examineze un alt subeşantion şi pentru verificarea	completă, imediat înainte de prelevarea cantităţii pentru analiză (alicota de test). 3.1.2. Furaje care pot fi măcinate după uscare — Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, eşantionul final se deshidratează astfel încât umiditatea sa să se reducă la 8-12 %, în conformitate cu procedura de preuscare descrisă la punctul 4.3 din metoda de determinare a umidităţii menţionată în partea A din anexa nr. 3. Se procedează apoi în conformitate cu indicaţiile de la punctul 3.1.1. 3.1.3. Furaje lichide sau semilichide — Se recoltează eşantionul final într-un recipient adecvat, curat şi uscat, dotat cu un sistem de închidere ermetică. Se amestecă cu grijă pentru a se asigura o omogenizare completă, imediat înainte de prelevarea cantităţii pentru analiză (alicota de test). 3.1.4. Alte furaje — Eşantioanele finale care nu pot fi preparate conform uneia dintre procedurile indicate anterior se tratează prin orice altă procedură prin care se asigură că cantităţile prelevate pentru analiză (alicota de test) sunt omogene şi reprezentative pentru eşantioanele finale. 3.2. Proceduri specifice în cazul examinării prin inspecţie vizuală sau la microscop sau în cazurile în care întregul eşantion agregat se omogenizează — În cazul unei examinări prin inspecţie vizuală (fără a recurge la microscop), întregul eşantion agregat sau final se utilizează pentru examinare. — În cazul unei examinări microscopice, laboratorul poate reduce eşantionul agregat sau poate efectua o reducere ulterioară a eşantionului redus. Eşantioanele finale pentru apărare şi, eventual, pentru referinţă sunt prelevate în urma unei proceduri echivalente cu procedura urmată pentru eşantionul final pentru asigurarea respectării legislaţiei.		

conformității cu nivelul maxim se utilizează media rezultatului celor două subeșantioane.

4. *Depozitarea eşantioanelor*

Eşantioanele trebuie păstrate la o temperatură care să nu le altereze compoziția. Eşantioanele destinate analizării prezenței vitaminelor sau substanțelor foarte sensibile la lumină se păstrează în condiții care să garanteze că eşantionul nu este afectat în mod negativ de lumină.

B. DISPOZIȚII PRIVIND REACTIVII ȘI APARATURA UTILIZATE ÎN METODELE DE ANALIZĂ

1. Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, toți reactivii destinați analizelor trebuie să fie puri din punct de vedere analitic (p.a.). Pentru analiza prezenței oligoelementelor, puritatea reactivilor se controlează printr-un test martor. În funcție de rezultatele obținute, poate fi necesară o purificare suplimentară a reactivilor.

2. Pentru orice operație care implică prepararea soluțiilor, diluția, clătirea sau spălarea, menționate în metodele de analiză și pentru care nu există indicații referitoare la natura solventului sau diluantului, se utilizează apa. Ca regulă generală, se utilizează apă demineralizată sau distilată. În cazuri speciale, care sunt indicate în metodele de analiză, apa trebuie supusă unor proceduri de purificare speciale.

3. Având în vedere dotarea uzuală a laboratoarelor de control, în metodele de analiză se menționează doar instrumentele și aparatura speciale sau care au utilizări specifice. Ele trebuie să fie curate, în special în cazul determinării unor cantități foarte mici de substanțe.

C. APLICAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI PREZENTAREA REZULTATELOR

1. *Procedura de extracție*

O serie de metode determină o procedură de extracție specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de extracție decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că

— În cazul în care întregul eşantion agregat este omogenizat, eşantioanele finale sunt prelevate din eşantionul agregat omogenizat.

— Pentru determinarea cornului secarei și a impurităților botanice nocive, eşantionul final trebuie împărțit în două subeșantioane cu o greutate egală de aproximativ 500 de grame. Se examinează un subeșantion. În cazul în care rezultatul subeșantioanelor este mai mic sau egal cu 50 % (prag analitic) din nivelul maxim, eşantionul este conform cu nivelul maxim. Dacă rezultatul este mai mare de 50 % din nivelul maxim, este necesar să se examineze un alt subeșantion și pentru verificarea conformității cu nivelul maxim se utilizează media rezultatului celor două subeșantioane.

4. *Depozitarea eşantioanelor*

Eşantioanele trebuie păstrate la o temperatură care să nu le altereze compoziția. Eşantioanele destinate analizării prezenței vitaminelor sau substanțelor foarte sensibile la lumină se păstrează în condiții care să garanteze că eşantionul nu este afectat în mod negativ de lumină.

B. DISPOZIȚII PRIVIND REACTIVII ȘI APARATURA UTILIZATE ÎN METODELE DE ANALIZĂ

1. Dacă nu se specifică altfel în metodele de analiză, toți reactivii destinați analizelor trebuie să fie puri din punct de vedere analitic (p.a.). Pentru analiza prezenței oligoelementelor, puritatea reactivilor se controlează printr-un test martor. În funcție de rezultatele obținute, poate fi necesară o purificare suplimentară a reactivilor.

2. Pentru orice operație care implică prepararea soluțiilor, diluția, clătirea sau spălarea, menționate în metodele de analiză și pentru care nu există indicații referitoare la natura solventului sau diluantului, se utilizează apa. Ca regulă generală, se utilizează apă demineralizată sau distilată. În

procedura de extracție utilizată are, pentru matricea analizată, o eficiență de extracție echivalentă cu procedura menționată în metodă. 2. Procedura de purificare O serie de metode determină o procedură de purificare specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de purificare decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de purificare utilizată determină, pentru matricea analizată, rezultate analitice echivalente cu procedura menționată în metodă. 3. Numărul de determinări În cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile, dacă rezultatul primei determinări este semnificativ ($> 50 \%$) mai mic decât specificația de control, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară. În cazul controlului nivelurilor minime sau maxime de aditivi furajeri, dacă rezultatul primei determinări este peste nivelul minim sau sub nivelul maxim, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară. În cazul controlului privind conținutul declarat pentru o anumită substanță sau un anumit ingredient, dacă rezultatul primei determinări confirmă conținutul declarat, adică rezultatul analizei se situează în interiorul intervalului de variație acceptat, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția	cazuri speciale, care sunt indicate în metodele de analiză, apa trebuie supusă unor proceduri de purificare speciale. 3. Având în vedere dotarea uzuală a laboratoarelor de control, în metodele de analiză se menționează doar instrumentele și aparatura speciale sau care au utilizări specifice. Ele trebuie să fie curate, în special în cazul determinării unor cantități foarte mici de substanțe. C. APLICAREA METODELOR DE ANALIZĂ ȘI PREZENTAREA REZULTATELOR 1. Procedura de extracție O serie de metode determină o procedură de extracție specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de extracție decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de extracție utilizată are, pentru matricea analizată, o eficiență de extracție echivalentă cu procedura menționată în metodă. 2. Procedura de purificare O serie de metode determină o procedură de purificare specifică. Ca regulă generală, se pot aplica alte proceduri de purificare decât cea la care se face referire în metodă dacă s-a dovedit că procedura de purificare utilizată determină, pentru matricea analizată, rezultate analitice echivalente cu procedura menționată în metodă. 3. Numărul de determinări În cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile, dacă rezultatul primei determinări este semnificativ ($> 50 \%$) mai mic decât specificația de control, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară.	

să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară (rezultatul analitic mediu se încadrează sau nu în intervalul acceptabil de variație a conținutului declarat).

În unele cazuri, acest interval acceptabil de variație este definit în legislație, cum ar fi Regulamentul (CE) nr. 767/2009 și Regulamentul (UE) 2019/4 al Parlamentului European și al Consiliului (⁹).

4. Raportarea metodei de analiză utilizate

Raportul de analiză menționează metoda de analiză utilizată.

5. Raportarea rezultatului analitic

Rezultatul analitic se exprimă în maniera indicată în metoda de analiză, cu un număr adecvat de zecimale și se ajustează, dacă este cazul, la conținutul de umiditate al eșantionului final înainte de preparare.

Majoritatea nivelurilor reglementate (de exemplu, nivelul maxim, nivelul minim) din legislația UE privind hrana pentru animale sunt stabilite în raport cu un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %. Prin urmare, în aceste cazuri, pentru a evalua rezultatul analitic măsurat pe eșantion în raport cu nivelul de reglementare, rezultatul analitic trebuie mai întâi împărțit la conținutul de substanță uscată al eșantionului (în %) înmulțit cu 88, astfel cum se indică în următoarea formulă:

$$R_{12\%} = \frac{88 R_{ana}}{100 - M_c} \text{ unde:}$$

M: conținutul de umiditate al eșantionului (în %). 100 – *M_c* reprezintă, prin urmare, conținutul de substanță uscată al eșantionului (în %).

R_{ana} : rezultatul analitic măsurat pe eșantion

În cazul controlului nivelurilor minime sau maxime de aditivi furajeri, dacă rezultatul primei determinări este peste nivelul minim sau sub nivelul maxim, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară.

În cazul controlului privind conținutul declarat pentru o anumită substanță sau un anumit ingredient, dacă rezultatul primei determinări confirmă conținutul declarat, adică rezultatul analizei se situează în interiorul intervalului de variație acceptat, nu sunt necesare alte determinări, cu condiția să fie aplicate procedurile calitative adecvate. În alte cazuri, o analiză duplicat (a doua determinare) este necesară pentru a exclude posibilitatea contaminării încrucișate interne sau a încurcării accidentale a eșantioanelor. Media celor două determinări este utilizată pentru o evaluare suplimentară (rezultatul analitic mediu se încadrează sau nu în intervalul acceptabil de variație a conținutului declarat). În unele cazuri, acest interval acceptabil de variație este definit în Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020.

4. Raportarea metodei de analiză utilizate

Raportul de analiză menționează metoda de analiză utilizată.

5. Raportarea rezultatului analitic

Rezultatul analitic se exprimă în maniera indicată în metoda de analiză, cu un număr adecvat de zecimale și se ajustează, dacă este cazul, la conținutul de umiditate al eșantionului final înainte de preparare.

Majoritatea nivelurilor reglementate (de exemplu, nivelul maxim, nivelul minim) din legislația UE privind hrana pentru animale sunt stabilite în raport cu un furaj cu un conținut de

R_1 rezultat pentru un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %; z % a se evalua în raport cu nivelul de reglementare. În plus, dacă sunt îndeplinite următoarele condiții: — rezultatul analizei este semnificativ (> 50 %) mai mic sau mai mare decât informațiile de etichetare/specificațiile care trebuie controlate (după caz, dacă trebuie controlat nivelul maxim, respectiv minim al informațiilor de etichetare/specificații); — conținutul de umiditate al furajelor eșantionate este cunoscut și se poate stabili faptul că corecția conținutului de umiditate nu va modifica evaluarea, atunci, cu condiția ca procedurile de calitate adecvate să fie aplicate și ca analiza să servească doar la verificarea conformității cu dispozițiile legale, corecția conținutului de umiditate ar putea fi omisă (de exemplu, în cazurile în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care acest lucru este necesar pentru interpretare. În cazul în care rezultatul analitic este ajustat pentru conținutul de umiditate, incertitudinea de măsurare corespunzătoare trebuie, de asemenea, să fie ajustată în cadrul aceleiași proceduri. În cazul determinării cornului secarei sau a impurităților botanice nocive prin examinare vizuală/microscopică, nu este necesară ajustarea conținutului de umiditate. 6. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile În ce privește substanțele indezirabile, în sensul Directivei 2002/32/CE, un produs destinat utilizării în furaje se consideră neconform cu conținutul maxim stabilit dacă rezultatul analitic calculat ca media a două determinări independente, referitor la un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat ca depășind conținutul maxim, ținând cont de incertitudinea de măsurare analitică extinsă folosind un	umiditate de 12 %. Prin urmare, în aceste cazuri, pentru a evalua rezultatul analitic măsurat pe eșantion în raport cu nivelul de reglementare, rezultatul analitic trebuie mai întâi împărțit la conținutul de substanță uscată al eșantionului (în %) înmulțit cu 88, astfel cum se indică în următoarea formulă: unde: Mc : conținutul de umiditate al eșantionului (în %). 100 – Mc reprezintă, prin urmare, conținutul de substanță uscată al eșantionului (în %). Rana : rezultatul analitic măsurat pe eșantion R12 % : rezultat pentru un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %; a se evalua în raport cu nivelul de reglementare. În plus, dacă sunt îndeplinite următoarele condiții: — rezultatul analizei este semnificativ (> 50 %) mai mic sau mai mare decât informațiile de etichetare/specificațiile care trebuie controlate (după caz, dacă trebuie controlat nivelul maxim, respectiv minim al informațiilor de etichetare/specificații); — conținutul de umiditate al furajelor eșantionate este cunoscut și se poate stabili faptul că corecția conținutului de umiditate nu va modifica evaluarea, atunci, cu condiția ca procedurile de calitate adecvate să fie aplicate și ca analiza să servească doar la verificarea conformității cu dispozițiile legale, corecția conținutului de umiditate ar putea fi omisă (de exemplu, în cazurile în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care acest lucru este necesar pentru interpretare. În cazul în care rezultatul analitic este ajustat pentru conținutul de umiditate, incertitudinea de măsurare corespunzătoare trebuie, de asemenea, să fie ajustată în cadrul aceleiași proceduri.		

factor de acoperire 2 care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 % și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă. Această procedură se aplică numai în cazurile în care metoda de analiză permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse și a ajustării pentru recuperare. (de exemplu, nu este necesar în cazul examinării vizuale/microscopice). În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens. Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse): (a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %. (b) ca „$x \pm U$”, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2 (¹⁰), care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Totuși, dacă rezultatul analizei este semnificativ (> 50 %) mai mic decât specificația de control și cu condiția ca procedurile calitative corespunzătoare să fie aplicate și ca analiza să servească doar verificării conformității cu prevederile legale, raportarea ratei de recuperare și a incertitudinii de măsurare	În cazul determinării cornului secarei sau a impurităților botanice nocive prin examinare vizuală/microscopică, nu este necesară ajustarea conținutului de umiditate. 6. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizelor de detectare a substanțelor indezirabile În ce privește substanțele indezirabile, în sensul Cerințelor sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, un produs destinat utilizării în furaje se consideră neconform cu conținutul maxim stabilit dacă rezultatul analitic calculat ca media a două determinări independente, referitor la un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat ca depășind conținutul maxim, ținând cont de incertitudinea de măsurare analitică extinsă folosind un factor de acoperire 2 care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 % și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă. Această procedură se aplică numai în cazurile în care metoda de analiză permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse și a ajustării pentru recuperare. (de exemplu, nu este necesar în cazul examinării vizuale/microscopice). În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens. Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse): (a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de		

analitică extinse ar putea fi omisă (de exemplu, în cazul în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care incertitudinea de măsurare este necesară pentru interpretare. 7. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizei conținutului de aditivi furajeri Pentru a verifica conformitatea cu conținutul minim și maxim autorizat de aditivi furajeri, prezența unui aditiv furajer este considerată neconformă cu conținutul minim și maxim stabilit dacă rezultatul analitic, calculat ca media două determinări independente, în raport cu un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat: — că depășește conținutul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă; — că este sub conținutul minim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a adăugat incertitudinea de măsurare analitică extinsă. În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens. Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse):	recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %. (b) ca „x +/- U”, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2 (10), care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Totuși, dacă rezultatul analizei este semnificativ (> 50 %) mai mic decât specificația de control și cu condiția ca procedurile calitative corespunzătoare să fie aplicate și ca analiza să servească doar verificării conformității cu prevederile legale, raportarea ratei de recuperare și a incertitudinii de măsurare analitică extinse ar putea fi omisă (de exemplu, în cazul în care nu există nicio specificație sau nivel de reglementare), cu excepția cazului în care incertitudinea de măsurare este necesară pentru interpretare. 7. Incertitudinea de măsurare analitică și rata de recuperare în cazul analizei conținutului de aditivi furajeri Pentru a verifica conformitatea cu conținutul minim și maxim autorizat de aditivi furajeri, prezența unui aditiv furajer este considerată neconformă cu conținutul minim și maxim stabilit dacă rezultatul analitic, calculat ca media două determinări independente, în raport cu un furaj cu un conținut de umiditate de 12 %, este considerat: — că depășește conținutul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare analitică extinsă;	

(a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %. (b) ca „x +/- U”, unde x este rezultatul analitic (media a două determinări) și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2 (11), care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.	— că este sub conținutul minim, ținând seama de incertitudinea de măsurare analitică extinsă și de ajustarea pentru recuperare. Aceasta înseamnă că, pentru a evalua conformitatea, concentrația analizată (și anume, media a două determinări) se utilizează după ce a fost ajustată pentru recuperare și după ce s-a adăugat incertitudinea de măsurare analitică extinsă. În cazul în care rezultatul analitic al eșantionului prelevat pentru apărare depășește conținutul maxim (fără a lua în considerare incertitudinea de măsurare analitică extinsă), acest lucru confirmă neconformitatea constatată cu eșantionul de control, în absența unor norme naționale specifice în acest sens. Rezultatul analitic se raportează în modul următor (în măsura în care metoda de analiză utilizată permite estimarea incertitudinii de măsurare analitică extinse): (a) ajustat pentru recuperare, dacă este cazul și dacă este relevant, cu menționarea faptului că a fost ajustat. Rata de recuperare trebuie indicată, cu excepția cazului în care corecția intrinsecă pentru eroare sistematică face parte din procedură, unde eroarea sistematică este diferența dintre valoarea măsurată și concentrația de referință. Ajustarea pentru recuperare nu este necesară în cazul în care rata de recuperare este între 90 și 110 %. (b) ca „x +/- U”, unde x este rezultatul analitic (media a două determinări) și U este incertitudinea de măsurare analitică extinsă, folosind un factor de acoperire 2 (11), care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.		
<i>ANEXA III</i> METODE DE ANALIZĂ DE CONTROL AL COMPOZIȚIEI MATERILOR PRIME FURAJERE ȘI AL FURAJELOR COMBINATE A. DETERMINAREA UMIDITĂȚII	Anexă nr.3 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor	Compatibil	

1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea conținutului de umiditate al furajelor. În cazul furajelor care conțin substanțe volatile, cum sunt acizii organici, este de notat că o dată cu determinarea conținutului de umiditate se determină și un număr semnificativ de substanțe volatile. Metoda nu se aplică în cazul analizei produselor lactate utilizate ca materii prime furajere și al furajelor combinate care constau în principal din produse lactate, analizei grăsimilor și uleiurilor de origine animală și vegetală sau analizei semințelor și a fructelor oleaginoase. Determinarea conținutului de umiditate din semințele oleaginoase se determină prin metoda prevăzută în EN ISO 665 „Determinarea conținutului de umiditate și de materii volatile”, cu mențiunea că boabele de soia trebuie să fie măcinate înainte de determinarea conținutului de umiditate. 2. Principiu Eșantionul se deshidratează în condiții specificate, care variază în funcție de natura furajelor. Pierdere de greutate se determină prin cântărire. Este necesar să se efectueze o uscare prealabilă atunci când se analizează furaje solide cu conținut ridicat de umiditate. 3. Aparatură 3.1. Moară construită dintr-un material care nu absoarbe umiditatea, ușor de curățat, care permite o zdrobire rapidă și uniformă, fără a provoca încălzire semnificativă, care evită pe cât posibil contactul cu aerul exterior și care corespunde cerințelor menționate la punctele 4.1.1 și 4.1.2 (de exemplu, micro-mori cu ciocane sau răcite cu apă, mori conice pliabile sau mori cu mecanism lent sau cu discuri dințate). 3.2. Balanță analitică, cu toleranță de 1 mg. 3.3. Recipiente uscate din metal care nu se corodează sau din sticlă cu capace ermetice; suprafața de lucru permite împrăștierea eşantionului până la aproximativ 0,3 g/cm².	METODE DE ANALIZĂ DE CONTROL AL COMPOZIȚIEI MATERIILOR PRIME FURAJERE ȘI AL FURAJELOR COMBinate A. DETERMINAREA UMIDITĂȚII 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea conținutului de umiditate al furajelor. În cazul furajelor care conțin substanțe volatile, cum sunt acizii organici, este de notat că o dată cu determinarea conținutului de umiditate se determină și un număr semnificativ de substanțe volatile. Metoda nu se aplică în cazul analizei produselor lactate utilizate ca materii prime furajere și al furajelor combinate care constau în principal din produse lactate, analizei grăsimilor și uleiurilor de origine animală și vegetală sau analizei semințelor și a fructelor oleaginoase. Determinarea conținutului de umiditate din semințele oleaginoase se determină prin metoda prevăzută în SM EN ISO 665:2020 „Determinarea conținutului de umiditate și de materii volatile”, cu mențiunea că boabele de soia trebuie să fie măcinate înainte de determinarea conținutului de umiditate. 2. Principiu Eșantionul se deshidratează în condiții specificate, care variază în funcție de natura furajelor. Pierdere de greutate se determină prin cântărire. Este necesar să se efectueze o uscare prealabilă atunci când se analizează furaje solide cu conținut ridicat de umiditate. 3. Aparatură 3.1. Moară construită dintr-un material care nu absoarbe umiditatea, ușor de curățat, care permite o zdrobire rapidă și uniformă, fără a provoca încălzire semnificativă, care evită pe cât posibil contactul cu aerul exterior și care corespunde cerințelor menționate la punctele 4.1.1 și 4.1.2 (de exemplu,	

3.4. Cuptor izoterm cu încălzire electrică ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ventilat corespunzător și care asigură o reglare rapidă a temperaturii (12). 3.5. Cuptor vidat cu încălzire electrică, reglabil, dotat cu o pompă de ulei și cu: fie un mecanism de introducere a aerului fierbinte uscat, fie un agent de desicare (de exemplu, oxid de calciu). 3.6. Desicator cu o placă din metal sau porțelan, groasă, perforată, conținând un agent de desicare eficient. 4. Procedura N.B.: Operațiile descrise în această secțiune se efectuează imediat după deschiderea ambalajelor care conțin eșantioanele. Analizele trebuie să fie efectuate cel puțin în duplicat. 4.1. Preparare 4.1.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.1.2 și 4.1.3 Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Dacă este necesar, se zdrobește sau se divizează astfel încât să se evite orice variație a conținutului de umiditate (a se vedea punctul 6). 4.1.2. Cereale și tărâte Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Se macină în particule din care cel puțin 50 % trec printr-o sită cu orificii de 0,5 mm și care nu determină un reziduu mai mare de 10 % în cazul folosirii unei site cu orificii rotunde cu diametru de 1 mm. 4.1.3. Furaje lichide sau păstoase, furaje constituite în mod predominant din uleiuri și grăsimi Se prelevează aproximativ 25 g din eșantion, se cântărește cu o abatere de 10 mg, se adaugă o cantitate adecvată de nisip anhidru cântărită cu o abatere de 10 mg și se amestecă până la obținerea unui produs omogen. 4.2. Uscare Se usucă un recipient (punctul 3.3) împreună cu capacul său în cuptorul reglat la 103 °C timp de 30 de minute +/- 1 min. Se	micro-mori cu ciocane sau răcite cu apă, mori conice pliabile sau mori cu mecanism lent sau cu discuri dințate). 3.2. Balanță analitică, cu toleranță de 1 mg. 3.3. Recipiente uscate din metal care nu se corodează sau din sticlă cu capace ermetice; suprafața de lucru permite împrăștierea eșantionului până la aproximativ 0,3 g/cm². 3.4. Cuptor izoterm cu încălzire electrică ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ventilat corespunzător și care asigură o reglare rapidă a temperaturii (12). 3.5. Cuptor vidat cu încălzire electrică, reglabil, dotat cu o pompă de ulei și cu: fie un mecanism de introducere a aerului fierbinte uscat, fie un agent de desicare (de exemplu, oxid de calciu). 3.6. Desicator cu o placă din metal sau porțelan, groasă, perforată, conținând un agent de desicare eficient. 4. Procedura N.B.: Operațiile descrise în această secțiune se efectuează imediat după deschiderea ambalajelor care conțin eșantioanele. Analizele trebuie să fie efectuate cel puțin în duplicat. 4.1. Preparare 4.1.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.1.2 și 4.1.3 Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Dacă este necesar, se zdrobește sau se divizează astfel încât să se evite orice variație a conținutului de umiditate (a se vedea punctul 6). 4.1.2. Cereale și tărâte Se prelevează cel puțin 50 g de eșantion. Se macină în particule din care cel puțin 50 % trec printr-o sită cu orificii de 0,5 mm și care nu determină un reziduu mai mare de 10 % în cazul folosirii unei site cu orificii rotunde cu diametru de 1 mm. 4.1.3. Furaje lichide sau păstoase, furaje constituite în mod predominant din uleiuri și grăsimi	

scoate din cuptor și se lasă să se răcească la temperatura ambiantă în desicator (punctul 3.6). 4.2.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.2.2 și 4.2.3 Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 1 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 103 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de patru ore, calculate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 103 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. În cazul furajelor constituite în mod predominant (> 50 %) din uleiuri și grăsimi de origine animală și vegetală, uscarea în cuptor se prelungește cu 30 de minute, la 103 °C. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate. 4.2.2. Cereale, făină fină, tărate și făină grunjoasă Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion măcinat și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 130 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de două ore, considerate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 130 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.	Se prelevează aproximativ 25 g din eșantion, se cântărește cu o abatere de 10 mg, se adaugă o cantitate adecvată de nisip anhidru cântărită cu o abatere de 10 mg și se amestecă până la obținerea unui produs omogen. 4.2. Uscare Se usucă un recipient (punctul 3.3) împreună cu capacul său în cuptorul reglat la 103 °C timp de 30 de minute +/- 1 min. Se scoate din cuptor și se lasă să se răcească la temperatura ambiantă în desicator (punctul 3.6). 4.2.1. Furaje care nu sunt menționate la punctele 4.2.2 și 4.2.3 Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 1 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 103 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de patru ore, calculate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 103 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. În cazul furajelor constituite în mod predominant (> 50 %) din uleiuri și grăsimi de origine animală și vegetală, uscarea în cuptor se prelungește cu 30 de minute, la 103 °C. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate. 4.2.2. Cereale, făină fină, tărate și făină grunjoasă Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion măcinat și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul preîncălzit la 130 °C. Pentru a	

4.2.3. Furaje combinate conținând peste 4 % zaharoză sau lactoză: materii prime furajere precum semințele de roșcove, produsele cerealiere hidrolizate, semințele de malț, bucăți de sfeclă uscată, solubilizate de pește și zaharuri

Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul vidat (punctul 3.5) preîncălzit la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil.

Se aduce presiunea la 100 Torr și se lasă la uscat, la această presiune, timp de patru ore, fie într-un curent de aer uscat și cald, fie cu ajutorul unui agent de desicare (aproximativ 300 g pentru 20 de eșantioane). În al doilea caz, pompa de vid se deconectează după ce se obține presiunea recomandată. Durata de uscare se calculează din momentul în care temperatura în cuptor revine la o valoare cuprinsă între 80 °C și 85 °C. Presiunea cuptorului se readuce cu grijă până la nivelul presiunii atmosferice. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate recipientul din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. Uscarea în cuptorul vidat se prelungește cu încă 30 de minute la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C și se recântărește. Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

4.3. Uscarea prealabilă (parțială)

Este necesară uscarea parțială a furajelor „umede” cu o fracțiune masică mai mică de 85 % substanță uscată (de exemplu, nutreț, rații totale amestecate, furaje nelichide) înainte de măcinarea fină, pentru a analiza substanțele stabile ale acestora; pentru substanțele instabile, uscarea parțială nu este posibilă.

împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil. Se lasă la uscat timp de două ore, considerate din momentul în care temperatura din cuptor revine la 130 °C. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate acesta din urmă din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg.

4.2.3. Furaje combinate conținând peste 4 % zaharoză sau lactoză: materii prime furajere precum semințele de roșcove, produsele cerealiere hidrolizate, semințele de malț, bucăți de sfeclă uscată, solubilizate de pește și zaharuri

Se cântărește recipientul împreună cu capacul său, cu o abatere de 0,5 mg. În recipientul respectiv se cântărește, cu o abatere de 1 mg, o cantitate de aproximativ 5 g de eșantion și se împrăștie uniform. Recipientul se introduce, fără capac, în cuptorul vidat (punctul 3.5) preîncălzit la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C. Pentru a împiedica scăderea inadecvată a temperaturii din cuptor, recipientul se introduce cât mai rapid posibil.

Se aduce presiunea la 100 Torr și se lasă la uscat, la această presiune, timp de patru ore, fie într-un curent de aer uscat și cald, fie cu ajutorul unui agent de desicare (aproximativ 300 g pentru 20 de eșantioane). În al doilea caz, pompa de vid se deconectează după ce se obține presiunea recomandată. Durata de uscare se calculează din momentul în care temperatura în cuptor revine la o valoare cuprinsă între 80 °C și 85 °C. Presiunea cuptorului se readuce cu grijă până la nivelul presiunii atmosferice. Se deschide cuptorul, se așază imediat capacul pe recipient, se scoate recipientul din cuptor, se lasă să se răcească timp de 30-45 de minute în desicator (punctul 3.6) și se cântărește cu o abatere de 1 mg. Uscarea în cuptorul vidat se prelungește cu încă 30 de minute la o temperatură cuprinsă între 80 °C și 85 °C și se recântărește.

Uscarea parțială se poate efectua cu un cuptor cu aer forțat, cu un cuptor cu microunde sau prin liofilizare. Cu excepția uscării parțiale prin liofilizare, scopul este uscarea furajului menținând în același timp temperatura eșantionului sub 60 °C, astfel încât compoziția chimică să fie minim afectată. Uscarea la temperaturi mai mari de 60 °C provoacă modificări chimice în furaje (de exemplu, degradarea proteinelor). Furajul uscat se echilibrează la temperatura camerei timp de aproximativ 15 minute înainte de măsurarea materiei uscate parțiale, astfel încât să se reducă la minimum modificarea potențială a umidității care poate apărea în timpul măcinării și depozitării. Uscarea la temperaturi mai mici de 60 °C nu îndepărtează toată apa din furaj; prin urmare, uscarea parțială (inițială) nu reprezintă substanța uscată totală a furajului. După uscare, subeșantionul este măcinat și analizat pentru a se stabili conținutul de substanță uscată (finală) al eșantionului parțial uscat (restul de umiditate între 3 % și 15 %) atunci când se determină alți constituenți chimici.

Prin urmare, se recomandă o procedură în două etape pentru determinarea substanței uscate. Se determină mai întâi conținutul parțial de substanță uscată (în cazul în care acesta este mai mic de 85 %), apoi se determină conținutul de substanță uscată rămasă pe un eșantion de testat măcinat și se înmulțește substanța uscată parțială cu substanța uscată rămasă pentru a determina conținutul total de substanță uscată.

5. *Calculul rezultatelor*

Conținutul de umiditate (X) al eșantionului, în procente, se calculează prin utilizarea formulelor următoare:

5.1. *Uscare fără uscare prealabilă*

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

unde:

m = greutatea inițială, în grame, a eșantionului de testat,

Diferența între cele două cântăriri nu trebuie să depășească 0,1 % în umiditate.

4.3. *Uscarea prealabilă (parțială)*

Este necesară uscarea parțială a furajelor „umedes” cu o fracțiune masică mai mică de 85 % substanță uscată (de exemplu, nutreț, rații totale amestecate, furaje nelichide) înainte de măcinarea fină, pentru a analiza substanțele stabile ale acestora; pentru substanțele instabile, uscarea parțială nu este posibilă.

Uscarea parțială se poate efectua cu un cuptor cu aer forțat, cu un cuptor cu microunde sau prin liofilizare. Cu excepția uscării parțiale prin liofilizare, scopul este uscarea furajului menținând în același timp temperatura eșantionului sub 60 °C, astfel încât compoziția chimică să fie minim afectată. Uscarea la temperaturi mai mari de 60 °C provoacă modificări chimice în furaje (de exemplu, degradarea proteinelor). Furajul uscat se echilibrează la temperatura camerei timp de aproximativ 15 minute înainte de măsurarea materiei uscate parțiale, astfel încât să se reducă la minimum modificarea potențială a umidității care poate apărea în timpul măcinării și depozitării. Uscarea la temperaturi mai mici de 60 °C nu îndepărtează toată apa din furaj; prin urmare, uscarea parțială (inițială) nu reprezintă substanța uscată totală a furajului. După uscare, subeșantionul este măcinat și analizat pentru a se stabili conținutul de substanță uscată (finală) al eșantionului parțial uscat (restul de umiditate între 3 % și 15 %) atunci când se determină alți constituenți chimici.

Prin urmare, se recomandă o procedură în două etape pentru determinarea substanței uscate. Se determină mai întâi conținutul parțial de substanță uscată (în cazul în care acesta este mai mic de 85 %), apoi se determină conținutul de substanță uscată rămasă pe un eșantion de testat măcinat și se înmulțește substanța uscată parțială cu substanța uscată

m₀=greutatea, în grame, a eşantionului de testat uscat.

5.2. Uscare cu uscare prealabilă (13)

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

unde:

m=greutatea inițială, în grame, a eşantionului de testat,

m=greutatea, în grame, a eşantionului de testat după uscare

₁ prealabilă,

m=greutatea, în grame, a eşantionului de testat după zdrobire

₂ sau măcinare,

m₀=greutatea, în grame, a eşantionului de testat uscat.

5.3. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu depășește 0,2 % din valoarea absolută pentru umiditate, cu excepția hranei umede pentru animale de companie și a produselor de ros pentru câini, în cazul cărora diferența nu depășește 0,5 % din valoarea absolută pentru umiditate.

6. Observație

Dacă zdrobirea se dovedește a fi necesară și dacă această acțiune poate modifica conținutul de umiditate al produsului, rezultatele analizei referitoare la componentele furajelor trebuie ajustate în funcție de conținutul de umiditate al eşantionului în starea lui inițială.

B. DETERMINAREA UMIDITĂȚII DIN GRĂSIMILE ȘI ULEIURILE ANIMALE ȘI VEGETALE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea conținutului în apă și substanțe volatile din grăsimile și uleiurile animale și vegetale.

2. Principiu

Eşantionul se usucă până la atingerea greutateii constante (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să

rămasă pentru a determina conținutul total de substanță uscată.

5. Calculul rezultatelor

Conținutul de umiditate (X) al eşantionului, în procente, se calculează prin utilizarea formulelor următoare:

5.1. Uscare fără uscare prealabilă

unde:

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

m = greutatea inițială, în grame, a eşantionului de testat,

m₀ = greutatea, în grame, a eşantionului de testat uscat.

5.2. Uscare cu uscare prealabilă (13)

unde:

m = greutatea inițială, în grame, a eşantionului de testat,

m₁ = greutatea, în grame, a eşantionului de testat după uscare prealabilă,

m₂ = greutatea, în grame, a eşantionului de testat după zdrobire sau măcinare,

m₀ = greutatea, în grame, a eşantionului de testat uscat.

5.3. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu depășește 0,2 % din valoarea absolută pentru umiditate, cu excepția hranei umede pentru animale de companie și a produselor de ros pentru câini, în cazul cărora diferența nu depășește 0,5 % din valoarea absolută pentru umiditate.

6. Observație

fie mai mică sau egală cu 1 mg) la 103 °C. Pierderea de greutate se determină prin cântărire. 3. Aparatură 3.1. Vas cu fund plat, din material rezistent la coroziune, cu diametru de 8-9 cm și adâncime de aproximativ 3 cm. 3.2. Termometru cu bulb întărit și cu tub de expansiune la capătul superior, gradat de la aproximativ 80 °C până la cel puțin 110 °C și lung de aproximativ 10 cm. 3.3. Cuvă cu nisip sau plită. 3.4. Desicator, conținând un agent de uscare eficient. 3.5. Balanță analitică. 4. Procedura Se cântăresc, cu o abatere de 1 mg, aproximativ 20 g din eșantionul omogenizat, în recipientul uscat și cântărit (punctul 3.1), conținând termometrul (punctul 3.2). Se încălzește pe cuva cu nisip sau pe plită (punctul 3.3), amestecând continuu cu termometrul, astfel încât temperatura să ajungă la 90 °C în aproximativ 7 minute. Se reduce intensitatea căldurii, urmărind frecvența cu care bulele se ridică de pe fundul vasului. Temperatura nu trebuie să depășească 105 °C. Se continuă amestecarea, răzuind fundul vasului, până când bulele încetează să se mai formeze. Pentru a asigura eliminarea completă a umidității, se reîncălzește de câteva ori la 103 ± 2 °C, răcind la 93 °C între încălziri succesive. În continuare se lasă să se răcească la temperatura camerei în desicator (punctul 3.4) și se cântărește. Se repetă această operație până când pierderea de greutate dintre două încălziri succesive nu depășește 2 mg. N.B. O creștere a greutateii eșantionului după încălzire repetată indică oxidarea grăsimilor, caz în care rezultatul se calculează prin cântărirea imediat înainte ca greutatea să înceapă să crească. 5. Calculul rezultatelor	Dacă zdrobirea se dovedește a fi necesară și dacă această acțiune poate modifica conținutul de umiditate al produsului, rezultatele analizei referitoare la componentele furajelor trebuie ajustate în funcție de conținutul de umiditate al eșantionului în starea lui inițială. B. DETERMINAREA UMIDITĂȚII DIN GRĂSIMILE ȘI ULEIURILE ANIMALE ȘI VEGETALE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea conținutului în apă și substanțe volatile din grăsimile și uleiurile animale și vegetale. 2. Principiu Eșantionul se usucă până la atingerea greutateii constante (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg) la 103 °C. Pierderea de greutate se determină prin cântărire. 3. Aparatură 3.1. Vas cu fund plat, din material rezistent la coroziune, cu diametru de 8-9 cm și adâncime de aproximativ 3 cm. 3.2. Termometru cu bulb întărit și cu tub de expansiune la capătul superior, gradat de la aproximativ 80 °C până la cel puțin 110 °C și lung de aproximativ 10 cm. 3.3. Cuvă cu nisip sau plită. 3.4. Desicator, conținând un agent de uscare eficient. 3.5. Balanță analitică. 4. Procedura Se cântăresc, cu o abatere de 1 mg, aproximativ 20 g din eșantionul omogenizat, în recipientul uscat și cântărit (punctul 3.1), conținând termometrul (punctul 3.2). Se încălzește pe cuva cu nisip sau pe plită (punctul 3.3), amestecând continuu cu termometrul, astfel încât temperatura să ajungă la 90 °C în aproximativ 7 minute. Se reduce intensitatea căldurii, urmărind frecvența cu care bulele se ridică de pe fundul vasului. Temperatura nu trebuie	

Conținutul de umiditate (X), ca procentaj din eșantion, este dat de următoarea formulă:

$$X = (m_1 - m_2) \frac{100}{m} \text{ unde:}$$

m = greutatea, în grame, a eșantionului de testat;

m_1 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său înainte de încălzire;

m_2 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său după încălzire.

Rezultatele mai mici de 0,05 % se înregistrează ca fiind „sub 0,05 %”.

Repetabilitate

Diferența de umiditate dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,1 %, în valoare absolută.

C. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE AZOT ȘI CALCULAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE BRUTE

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Prezenta metodă permite determinarea conținutului de proteine brute din furaje pe baza conținutului de azot, determinat conform metodei Kjeldahl ([14](#)).

2. Principiu

Eșantionul se dizolvă cu acid sulfuric în prezența unui catalizator. Soluția acidă se alcalinizează cu soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul se distilează și se colectează într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, al cărei exces se titrează cu o soluție etalon de hidroxid de sodiu.

Ca alternativă, amoniacul eliberat se distilează într-o soluție de acid boric în exces, urmat de titrare cu o soluție de acid clorhidric sau acid sulfuric.

3. Reactivi

să depășească 105 °C. Se continuă amestecarea, răzuind fundul vasului, până când bulele încetează să se mai formeze. Pentru a asigura eliminarea completă a umidității, se reîncălzește de câteva ori la 103 ± 2 °C, răcind la 93 °C între încălziri succesive. În continuare se lasă să se răcească la temperatura camerei în desicator (punctul 3.4) și se cântărește. Se repetă această operație până când pierderea de greutate dintre două încălziri succesive nu depășește 2 mg.

N.B. O creștere a greutății eșantionului după încălzire repetată indică oxidarea grăsimilor, caz în care rezultatul se calculează prin cântărirea imediat înainte ca greutatea să înceapă să crească.

5. Calculul rezultatelor

Conținutul de umiditate (X), ca procentaj din eșantion, este dat de următoarea formulă:

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

unde:

m = greutatea, în grame, a eșantionului de testat;

m_1 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său înainte de încălzire;

m_2 = greutatea, în grame, a vasului împreună cu conținutul său după încălzire.

Rezultatele mai mici de 0,05 % se înregistrează ca fiind „sub 0,05 %”.

Repetabilitate

Diferența de umiditate dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,1 %, în valoare absolută.

3.1. Sulfat de potasiu. 3.2. Catalizator: oxid de cupru (II) CuO sau sulfat de cupru (II) pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 3.3. Zinc granulat. 3.4. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$. 3.5. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$. 3.6. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$. 3.7. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$. 3.8. Indicator roșu de metil; se dizolvă 300 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$. 3.9. Soluție de hidroxid de sodiu (se poate utiliza soluție de calitate tehnică) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$. 3.10. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$. 3.11. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$. 3.12. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată. 3.13. Acetanilidă (m.p. = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, conținutul în N = 10,36 %). 3.14. Zaharoză (fără azot). 3.15. Acid boric (H_3BO_3). 3.16. Soluție de indicator roșu de metil: se dizolvă 100 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol sau metanol. 3.17. Soluție de verde de bromocrezol: se dizolvă 100 mg de verde de bromocrezol în 100 ml de etanol sau metanol. 3.18. Soluție de acid boric (10 g/l-40 g/l, în funcție de aparatura utilizată) Când se aplică detectarea prin colorimetrie a punctului final, indicatorii roșu de metil și bromocrezol trebuie adăugați la soluțiile de acid boric. Dacă se prepară 1 litru de soluție de acid boric, înainte de ajustarea de volum, se adaugă 7 ml de soluție	C. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE AZOT ȘI CALCULAREA CONȚINUTULUI DE PROTEINE BRUTE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Prezenta metodă permite determinarea conținutului de proteine brute din furaje pe baza conținutului de azot, determinat conform metodei Kjeldahl (14). 2. Principiu Eșantionul se dizolvă cu acid sulfuric în prezența unui catalizator. Soluția acidă se alcalinizează cu soluție de hidroxid de sodiu. Amoniacul se distilează și se colectează într-o cantitate măsurată de acid sulfuric, al cărei exces se titrează cu o soluție etalon de hidroxid de sodiu. Ca alternativă, amoniacul eliberat se distilează într-o soluție de acid boric în exces, urmat de titrare cu o soluție de acid clorhidric sau acid sulfuric. 3. Reactivi 3.1. Sulfat de potasiu. 3.2. Catalizator: oxid de cupru (II) CuO sau sulfat de cupru (II) pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 3.3. Zinc granulat. 3.4. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$. 3.5. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$. 3.6. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$. 3.7. Acid sulfuric, soluție volumetrică standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$. 3.8. Indicator roșu de metil; se dizolvă 300 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$. 3.9. Soluție de hidroxid de sodiu (se poate utiliza soluție de calitate tehnică) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$. 3.10. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.	

de indicator roșu de metil (punctul 3.16) și 10 ml de soluție verde de bromocrezol (punctul 3.17). În funcție de apa utilizată, pH-ul soluției de acid boric poate diferi de la lot la lot. pH-ul soluției de acid boric trebuie să fie între 4,3 și 4,7. Adesea este necesară o ajustare cu ajutorul unui mic volum de substanță alcalină pentru a obține un martor pozitiv. <i>Notă:</i> Adăugarea a aproximativ 3-4 ml de NaOH (punctul 3.11) în 1 litru de acid boric 10 g/l oferă, de obicei, ajustări bune. Soluția se păstrează la temperatura camerei și, pe durata păstrării, se protejează de lumină și de surse de vapori de amoniac. 3.19. Acid clorhidric, soluție volumetrică standard, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$. <i>Notă:</i> Dacă în calcule se fac ajustările necesare, se pot folosi alte concentrații de soluții volumetrice (punctele 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 și 3.19). Concentrațiile se exprimă întotdeauna cu patru zecimale. 4. Aparatură Aparatură adecvată pentru efectuarea dizolvării, distilării și titrării conform procedurii Kjeldahl. 5. Procedura 5.1. Dizolvarea Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 0,001 g și se transferă eșantionul în vasul aparatului de dizolvare. Se adaugă 15 g de sulfat de potasiu (punctul 3.1), o cantitate adecvată de catalizator (punctul 3.2) [0,3-0,4 g oxid de cupru (II) sau 0,9-1,2 g sulfat de cupru (II) pentahidrat], 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.4) și, dacă este necesar, câteva granule de piatră ponce (punctul 3.12), apoi se amestecă. Se încălzește vasul, la început moderat, agitând circular din când, dacă este cazul, până când materia s-a carbonizat și spuma a dispărut; apoi se încălzește mai intens, până când lichidul fierbe constant. Încălzirea este adecvată dacă acidul aflat în	3.11. Hidroxid de sodiu, soluție volumetrică standard, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$. 3.12. Piatră ponce granulată, spălată în acid clorhidric și calcinată. 3.13. Acetanilidă (m.p. = 114 °C, conținutul în N = 10,36 %). 3.14. Zaharoză (fără azot). 3.15. Acid boric (H_3BO_3). 3.16. Soluție de indicator roșu de metil: se dizolvă 100 mg de roșu de metil în 100 ml de etanol sau metanol. 3.17. Soluție de verde de bromocrezol: se dizolvă 100 mg de verde de bromocrezol în 100 ml de etanol sau metanol. 3.18. Soluție de acid boric (10 g/l-40 g/l, în funcție de aparatura utilizată) Când se aplică detectarea prin colorimetrie a punctului final, indicatorii roșu de metil și bromocrezol trebuie adăugați la soluțiile de acid boric. Dacă se prepară 1 litru de soluție de acid boric, înainte de ajustarea de volum, se adaugă 7 ml de soluție de indicator roșu de metil (punctul 3.16) și 10 ml de soluție verde de bromocrezol (punctul 3.17). În funcție de apa utilizată, pH-ul soluției de acid boric poate diferi de la lot la lot. pH-ul soluției de acid boric trebuie să fie între 4,3 și 4,7. Adesea este necesară o ajustare cu ajutorul unui mic volum de substanță alcalină pentru a obține un martor pozitiv. <i>Notă:</i> Adăugarea a aproximativ 3-4 ml de NaOH (punctul 3.11) în 1 litru de acid boric 10 g/l oferă, de obicei, ajustări bune. Soluția se păstrează la temperatura camerei și, pe durata păstrării, se protejează de lumină și de surse de vapori de amoniac. 3.19. Acid clorhidric, soluție volumetrică standard, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$. <i>Notă:</i> Dacă în calcule se fac ajustările necesare, se pot folosi alte concentrații de soluții volumetrice (punctele 3.5, 3.6, 3.7,	

fierbere se condensează pe peretele vasului. Se previne supraîncălzirea marginilor și lipirea particulelor organice de acestea. Când soluția devine limpede și de culoare verde deschis, se continuă fierberea timp de încă două ore, apoi se lasă să se răcească. 5.2. Distilarea Se adaugă cu atenție apă suficientă pentru a asigura dizolvarea completă a sulfaților. Se lasă la răcit și apoi se adaugă, dacă este cazul, câteva granule de zinc (punctul 3.3). Se procedează ca la punctul 5.2.1 sau 5.2.2. 5.2.1. Distilarea în acid sulfuric În vasul de colectare al aparatului de distilare se introduce o cantitate de 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.5) sau (punctul 3.7), măsurată cu exactitate, în funcție de conținutul estimat de azot. Se adăugă câteva picături de indicator roșu de metil (punctul 3.8). Se conectează vasul de dizolvare la condensatorul aparatului de distilare și se scufundă capătul condensatorului în lichidul din vasul de colectare până la o adâncime de cel puțin 1 cm (a se vedea observația 8.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9) în vasul de dizolvare, fără pierderi de amoniac (a se vedea observația 8.1). Se încălzește vasul până la distilarea completă a amoniacului. 5.2.2. Distilarea în acid boric În cazul în care titrarea amoniacului conținut în distilat se face manual, se aplică procedura de mai jos. În cazul în care unitatea de distilare este complet automatizată, inclusiv titrarea amoniacului conținut în distilat, se urmează instrucțiunile de operare a unității de distilare puse la dispoziție de fabricant. Sub orificiul de evacuare al condensatorului se așază un vas de colectare conținând 25-30 ml de soluție de acid boric (punctul 3.18), astfel încât tubul de evacuare se află sub nivelul suprafeței soluției de acid boric în exces. Se reglează unitatea	3.10, 3.11 și 3.19). Concentrațiile se exprimă întotdeauna cu patru zecimale. 4. Aparatură Aparatură adecvată pentru efectuarea dizolvării, distilării și titrării conform procedurii Kjeldahl. 5. Procedura 5.1. Dizolvarea Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 0,001 g și se transferă eșantionul în vasul aparatului de dizolvare. Se adaugă 15 g de sulfat de potasiu (punctul 3.1), o cantitate adecvată de catalizator (punctul 3.2) [0,3-0,4 g oxid de cupru (II) sau 0,9-1,2 g sulfat de cupru (II) pentahidrat], 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.4) și, dacă este necesar, câteva granule de piatră ponce (punctul 3.12), apoi se amestecă. Se încălzește vasul, la început moderat, agitând circular din când, dacă este cazul, până când materia s-a carbonizat și spuma a dispărut; apoi se încălzește mai intens, până când lichidul fierbe constant. Încălzirea este adecvată dacă acidul aflat în fierbere se condensează pe peretele vasului. Se previne supraîncălzirea marginilor și lipirea particulelor organice de acestea. Când soluția devine limpede și de culoare verde deschis, se continuă fierberea timp de încă două ore, apoi se lasă să se răcească. 5.2. Distilarea Se adaugă cu atenție apă suficientă pentru a asigura dizolvarea completă a sulfaților. Se lasă la răcit și apoi se adaugă, dacă este cazul, câteva granule de zinc (punctul 3.3). Se procedează ca la punctul 5.2.1 sau 5.2.2. 5.2.1. Distilarea în acid sulfuric În vasul de colectare al aparatului de distilare se introduce o cantitate de 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.5) sau (punctul 3.7), măsurată cu exactitate, în funcție de conținutul estimat	

de distilare astfel încât să elibereze 50 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9). Unitatea de distilare se operează în conformitate cu instrucțiunile fabricantului, distilându-se complet amoniacul eliberat prin adăugarea de soluție de hidroxid de sodiu. Distilatul se colectează în soluția de acid boric receptoare. Cantitatea de distilat (timpul de distilare în vapori) depinde de cantitatea de azot din eșantion. Se urmează instrucțiunile fabricantului. <i>Notă:</i> În cazul unei unități de distilare semiautomate, adăugarea hidroxidului de sodiu în exces și distilarea în vapori se efectuează automat. 5.3. Titrarea Se procedează ca la punctul 5.3.1 sau 5.3.2. 5.3.1. Acid sulfuric Se titrează excesul de acid sulfuric în vasul de colectare cu soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11), în funcție de concentrația acidului sulfuric utilizat, până se atinge punctul final. 5.3.2. Acid boric Cu ajutorul unei biurete se titrează conținutul vasului de colectare cu soluție volumetrică standard de acid clorhidric (punctul 3.19) sau cu soluție volumetrică standard de acid sulfuric (punctul 3.6) și se citește cantitatea de soluție de titrare utilizată. Când se aplică detectarea colorimetrică a punctului final, acesta este atins la prima apariție în conținut a culorii roz. Citirea biuretei se estimează cu o abatere de 0,05 ml. Vizualizarea punctului final poate fi facilitată de o placă de agitator magnetic iluminat sau de un detector fotometric. Aceasta poate fi efectuată automat prin utilizarea unui aparat de distilare cu vapori cu titrare automată. Operarea specifică a aparatului de distilare sau a celui de distilare/titrare se face conform instrucțiunilor fabricantului.	de azot. Se adăugă câteva picături de indicator roșu de metil (punctul 3.8). Se conectează vasul de dizolvare la condensatorul aparatului de distilare și se scufundă capătul condensatorului în lichidul din vasul de colectare până la o adâncime de cel puțin 1 cm (a se vedea observația 8.3). Se toarnă încet 100 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9) în vasul de dizolvare, fără pierderi de amoniac (a se vedea observația 8.1). Se încălzește vasul până la distilarea completă a amoniacului. 5.2.2. Distilarea în acid boric În cazul în care titrarea amoniacului conținut în distilat se face manual, se aplică procedura de mai jos. În cazul în care unitatea de distilare este complet automatizată, inclusiv titrarea amoniacului conținut în distilat, se urmează instrucțiunile de operare a unității de distilare puse la dispoziție de fabricant. Sub orificiul de evacuare al condensatorului se așază un vas de colectare conținând 25-30 ml de soluție de acid boric (punctul 3.18), astfel încât tubul de evacuare se află sub nivelul suprafeței soluției de acid boric în exces. Se reglează unitatea de distilare astfel încât să elibereze 50 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.9). Unitatea de distilare se operează în conformitate cu instrucțiunile fabricantului, distilându-se complet amoniacul eliberat prin adăugarea de soluție de hidroxid de sodiu. Distilatul se colectează în soluția de acid boric receptoare. Cantitatea de distilat (timpul de distilare în vapori) depinde de cantitatea de azot din eșantion. Se urmează instrucțiunile fabricantului. <i>Notă:</i> În cazul unei unități de distilare semiautomate, adăugarea hidroxidului de sodiu în exces și distilarea în vapori se efectuează automat. 5.3. Titrarea Se procedează ca la punctul 5.3.1 sau 5.3.2. 5.3.1. Acid sulfuric	

Notă: În cazul în care se utilizează un sistem automat de titrare, aceasta începe imediat după începerea distilării și se utilizează soluția de acid boric 1 % (punctul 3.18).

În cazul care se utilizează o unitate de distilare complet automată, titrarea automată a amoniacului poate fi efectuată, de asemenea, prin detectarea punctului final cu ajutorul unui sistem pH potențimetric.

În acest caz, se utilizează un aparat de titrare automat, cu pH-metru. pH-metrul se calibrează în mod corespunzător în intervalul de pH 4-7, folosindu-se proceduri de laborator normale de calibrare a pH-ului.

Punctul final al titrării exprimat în pH este atins la valoarea de 4,6, reprezentând punctul cel mai de jos al curbei de titrare (punctul de inflexiune).

5.4. Testul martor

Pentru a confirma faptul că reactivii nu conțin azot, se efectuează un test martor (dizolvare, distilare și titrare), folosind 1 g de zaharoză (punctul 3.14) în locul eșantionului.

6. Calculul rezultatelor

Calcularea se efectuează în conformitate cu punctul 6.1 sau 6.2.

6.1. Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.1

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

$$\frac{(V_0 - V_1) \cdot c \cdot 0,0141006}{m} \cdot 25$$

m

unde:

V=volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în testul martor;

V=volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în titrarea eșantionului;

c=concentrația (mol/l) a hidroxidului de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11);

m = greutatea (g) a eșantionului.

Se titrează excesul de acid sulfuric în vasul de colectare cu soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11), în funcție de concentrația acidului sulfuric utilizat, până se atinge punctul final.

5.3.2. Acid boric

Cu ajutorul unei biurete se titrează conținutul vasului de colectare cu soluție volumetrică standard de acid clorhidric (punctul 3.19) sau cu soluție volumetrică standard de acid sulfuric (punctul 3.6) și se citește cantitatea de soluție de titrare utilizată.

Când se aplică detectarea colorimetrică a punctului final, acesta este atins la prima apariție în conținut a culorii roz. Citirea biuretei se estimează cu o abatere de 0,05 ml. Vizualizarea punctului final poate fi facilitată de o placă de agitator magnetic iluminat sau de un detector fotometric.

Aceasta poate fi efectuată automat prin utilizarea unui aparat de distilare cu vapori cu titrare automată.

Operarea specifică a aparatului de distilare sau a celui de distilare/titrare se face conform instrucțiunilor fabricantului.

Notă: În cazul în care se utilizează un sistem automat de titrare, aceasta începe imediat după începerea distilării și se utilizează soluția de acid boric 1 % (punctul 3.18).

În cazul care se utilizează o unitate de distilare complet automată, titrarea automată a amoniacului poate fi efectuată, de asemenea, prin detectarea punctului final cu ajutorul unui sistem pH potențimetric.

În acest caz, se utilizează un aparat de titrare automat, cu pH-metru. pH-metrul se calibrează în mod corespunzător în intervalul de pH 4-7, folosindu-se proceduri de laborator normale de calibrare a pH-ului.

Punctul final al titrării exprimat în pH este atins la valoarea de 4,6, reprezentând punctul cel mai de jos al curbei de titrare (punctul de inflexiune).

5.4. Testul martor

6.2. *Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.2*

6.2.1. **Titrare cu acid clorhidric**

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

$$\frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m} \cdot 1,46,25$$

m

unde:

m = greutatea (g) a părții de testat;

c=concentrația (mol/l) a soluției volumetrice standard de acid clorhidric (punctul 3.19);

V =volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în testul martor;

0

V =volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în partea de testat.

1

6.2.2. **Titrare cu acid sulfuric**

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

$$\frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m} \cdot 2,86,25$$

m

unde:

m = greutatea (g) a părții de testat;

c=concentrația (mol/l) a soluției volumetrice standard de acid sulfuric (punctul 3.6);

V =volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în testul martor;

0

V =volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în partea de testat.

1

7. **Verificarea metodei**

7.1. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească:

— 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %;

Pentru a confirma faptul că reactivii nu conțin azot, se efectuează un test martor (dizolvare, distilare și titrare), folosind 1 g de zaharoză (punctul 3.14) în locul eșantionului.

6. Calculul rezultatelor

Calcularea se efectuează în conformitate cu punctul 6.1 sau 6.2.

6.1. Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.1

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

unde:

$$\frac{(V_0 - V_1) \cdot c}{m} \cdot 0,0141006,25$$

m

V₀ = volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în testul martor;

V₁ = volumul (ml) de NaOH (punctul 3.10 sau 3.11) folosit în titrarea eșantionului;

c = concentrația (mol/l) a hidroxidului de sodiu (punctul 3.10 sau 3.11);

m = greutatea (g) a eșantionului.

6.2. Calcularea titrării în conformitate cu punctul 5.3.2

6.2.1. Titrare cu acid clorhidric

Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule:

unde:

$$\frac{(V_1 - V_0) \cdot c}{m} \cdot 2,86,25$$

m

m = greutatea (g) a părții de testat;

c = concentrația (mol/l) a soluției volumetrice standard de acid clorhidric (punctul 3.19);

— 2,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %; — 0,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %. 7.2. Reproductibilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească: — 1,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %; — 9,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %; — 3,6 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %. 7.3. Acuratețea Analiza (dizolvare, distilare și titrare) se efectuează pe o cantitate adecvată de acetanilidă (punctul 3.13) (de exemplu, 0,2-0,3 g), în prezența a 1 g zaharoză (punctul 3.14); 1 g de acetanilidă consumă 14,80 ml de acid sulfuric (punctul 3.5). Recuperarea trebuie să fie de cel puțin 99 %. 8. Observații 8.1. Aparatura poate fi de tip manual, semiautomat sau automat. Dacă aparatura necesită un transfer între etapele de dizolvare și distilare, acest transfer trebuie realizat fără pierderi. Dacă vasul aparatului de distilare nu este prevăzut cu o pâlnie de picurare, se adaugă hidroxidul de sodiu imediat înainte de conectarea vasului la condensator, turnând încet lichidul pe marginea vasului. 8.2. Dacă produsul de dizolvare se solidifică, se reîncepe determinarea folosind o cantitate mai mare de acid sulfuric (punctul 3.4) decât cea menționată la punctul 5.1. 8.3. Pentru produsele cu conținut scăzut de azot, volumul de acidul sulfuric (punctul 3.7) care trebuie introdus în vasul de colectare poate fi redus, dacă este cazul, la 10 sau 15 ml și completat până la 25 ml cu apă.	V0 = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în testul martor; V1 = volumul (în ml) de acid clorhidric utilizat în partea de testat. 6.2.2. Titrare cu acid sulfuric Conținutul de proteine brute, exprimat ca procent din greutate, se calculează conform următoarei formule: unde: m = greutatea (g) a părții de testat; c = concentrația (mol/l) a soluției volumetric standard de acid sulfuric (punctul 3.6); V0 = volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în testul martor; V1 = volumul (în ml) de acid sulfuric (punctul 3.6) utilizat în partea de testat. 7. Verificarea metodei 7.1. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească: — 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %; — 2,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %; — 0,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %. 7.2. Reproductibilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească: — 1,8 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mic de 20 %; — 9,0 % relativ la valoarea mai mare, pentru un conținut de proteine brute cuprins între 20 și 40 %;		

8.4. Pentru analizele curente, în vederea determinării conținutului de proteine brute se pot aplica metode alternative de analiză, dar metoda Kjeldahl descrisă în prezenta parte C este metoda de referință. Echivalența dintre rezultatele obținute cu metoda alternativă (de exemplu, DUMAS) și cele obținute prin metoda de referință trebuie demonstrată pentru fiecare matrice în mod individual. Întrucât rezultatele obținute cu o metodă alternativă, chiar și după verificarea echivalenței, pot devia ușor față de rezultatele obținute cu metoda de referință, este necesar a menționa în raportul analitic metoda de analiză utilizată pentru determinarea conținutului de proteine brute. D. DETERMINAREA UREEI 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea conținutului de uree utilizată ca aditiv furajer în furajele pentru rumegătoare. 2. Principii Eșantionul este pus în suspensie în apă, în care s-a adăugat un produs de limpezire. Suspensia se filtrează. Conținutul în uree al filtratului este determinat după adăugarea de 4-dimetilaminobenzaldehidă (4-DMAB), prin măsurarea densității optice la o lungime de undă de 420 nm. 3. Reactivi 3.1. Soluție de 4-dimetilaminobenzaldehidă: se dizolvă 1,6 g de 4-DMAB în 100 ml de etanol 96 % și se adaugă 10 ml de acid clorhidric (ρ_{20} 1,19 g/ml). Acest reactiv se conservă timp de maximum două săptămâni. 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Cărbune activ care nu absoarbe ureea (de controlat). 3.5. Uree, soluție 0,1 % (greutate/volum).	— 3,6 % în valoare absolută, pentru un conținut de proteine brute mai mare de 40 %. 7.3. Acuratețea Analiza (dizolvare, distilare și titrare) se efectuează pe o cantitate adecvată de acetanilidă (punctul 3.13) (de exemplu, 0,2-0,3 g), în prezența a 1 g zaharoză (punctul 3.14); 1 g de acetanilidă consumă 14,80 ml de acid sulfuric (punctul 3.5). Recuperarea trebuie să fie de cel puțin 99 %. 8. Observații 8.1. Aparatura poate fi de tip manual, semiautomat sau automat. Dacă aparatura necesită un transfer între etapele de dizolvare și distilare, acest transfer trebuie realizat fără pierderi. Dacă vasul aparatului de distilare nu este prevăzut cu o pâlnie de picurare, se adaugă hidroxidul de sodiu imediat înainte de conectarea vasului la condensator, turnând încet lichidul pe marginea vasului. 8.2. Dacă produsul de dizolvare se solidifică, se reîncepe determinarea folosind o cantitate mai mare de acid sulfuric (punctul 3.4) decât cea menționată la punctul 5.1. 8.3. Pentru produsele cu conținut scăzut de azot, volumul de acidul sulfuric (punctul 3.7) care trebuie introdus în vasul de colectare poate fi redus, dacă este cazul, la 10 sau 15 ml și completat până la 25 ml cu apă. 8.4. Pentru analizele curente, în vederea determinării conținutului de proteine brute se pot aplica metode alternative de analiză, dar metoda Kjeldahl descrisă în prezenta parte C este metoda de referință. Echivalența dintre rezultatele obținute cu metoda alternativă (de exemplu, DUMAS) și cele obținute prin metoda de referință trebuie demonstrată pentru fiecare matrice în mod individual. Întrucât rezultatele obținute cu o metodă alternativă, chiar și după verificarea echivalenței, pot devia ușor față de rezultatele obținute cu metoda de referință, este necesar a	

4. Aparatură 4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm. 4.2. Eprubete: 160 × 16 mm cu dopuri de sticlă șlefuită. 4.3. Spectrofotometru. 5. Procedura 5.1. Analiza eșantionului Se cântăresc 2 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 1 g de cărbune activ (punctul 3.4) într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml de apă și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2), se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde și se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator. Se completează volumul cu apă, se agită și se filtrează. Se îndepărtează 5 ml de filtrat transparent și incolor, se introduc în eprubete cu dop de sticlă șlefuită, se adaugă 5 ml de soluție de 4-DMAB (punctul 3.1) și se amestecă. Se introduc eprubetele într-o baie de apă la 20 °C (+/- 4 °C). După 15 minute se măsoară densitatea optică a soluției de eșantion cu spectrofotometrul la 420 nm. Se compară cu soluția de reactivi pentru testul martor. 5.2. Curba de calibrare Se îndepărtează volume de 1, 2, 4, 5 și 10 ml din soluția de uree (punctul 3.5), se introduc în baloanele gradate de 100 ml și se completează volumul cu apă. Se îndepărtează 5 ml din fiecare soluție, se adaugă în fiecare 5 ml de soluție 4-DMAB (punctul 3.1), se omogenizează și se măsoară densitatea optică conform indicațiilor de mai sus cu o soluție martor care conține 5 ml de 4-DMAB și 5 ml de apă în care nu există uree. Se trasează curba de calibrare. 6. Calculul rezultatelor Se determină cantitatea de uree din eșantion cu ajutorul curbei de calibrare. Rezultatul se exprimă în mg de uree per kg eșantion. 7. Evaluarea metodei	menționa în raportul analitic metoda de analiză utilizată pentru determinarea conținutului de proteine brute. D. DETERMINAREA UREEI 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea conținutului de uree utilizată ca aditiv furajer în furajele pentru rumegătoare. 2. Principiu Eșantionul este pus în suspensie în apă, în care s-a adăugat un produs de limpezire. Suspensia se filtrează. Conținutul în uree al filtratului este determinat după adăugarea de 4-dimetilaminobenzaldehidă (4-DMAB), prin măsurarea densității optice la o lungime de undă de 420 nm. 3. Reactivi 3.1. Soluție de 4-dimetilaminobenzaldehidă: se dizolvă 1,6 g de 4-DMAB în 100 ml de etanol 96 % și se adaugă 10 ml de acid clorhidric (ρ₂₀ 1,19 g/ml). Acest reactiv se conservă timp de maximum două săptămâni. 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, K₄Fe(CN)₆ 3H₂O în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Cărbune activ care nu absoarbe ureea (de controlat). 3.5. Uree, soluție 0,1 % (greutate/volum). 4. Aparatură 4.1. Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm. 4.2. Eprubete: 160 × 16 mm cu dopuri de sticlă șlefuită. 4.3. Spectrofotometru. 5. Procedura 5.1. Analiza eșantionului Se cântăresc 2 g de eșantion cu abatere de 1 mg și se introduc împreună cu 1 g de cărbune activ (punctul 3.4) într-un balon	

7.1. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească: — La 420 nm — 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg; — 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 7 000 mg/kg; — 20 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 7 000 mg/kg sau mai mult. — La 435 nm — 40 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg; — 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 9 000 mg/kg; — 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 9 000 mg/kg sau mai mult. 7.2. Reproductibilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească: — La 420 nm — 3 000 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 12 000 mg/kg; — 4 500 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree de 12 000 mg/kg sau mai mult. — La 435 nm — 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 8 000 mg/kg; — 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 8 000 mg/kg sau mai mult. 8. Rezultatele unui studiu colaborativ	gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml de apă și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2), se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde și se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator. Se completează volumul cu apă, se agită și se filtrează. Se îndepărtează 5 ml de filtrat transparent și incolor, se introduc în eprubete cu dop de sticlă șlefuită, se adaugă 5 ml de soluție de 4-DMAB (punctul 3.1) și se amestecă. Se introduc eprubetele într-o baie de apă la 20 °C (+/- 4 °C). După 15 minute se măsoară densitatea optică a soluției de eșantion cu spectrofotometrul la 420 nm. Se compară cu soluția de reactivi pentru testul martor. 5.2. Curba de calibrare Se îndepărtează volume de 1, 2, 4, 5 și 10 ml din soluția de uree (punctul 3.5), se introduc în baloanele gradate de 100 ml și se completează volumul cu apă. Se îndepărtează 5 ml din fiecare soluție, se adaugă în fiecare 5 ml de soluție 4-DMAB (punctul 3.1), se omogenizează și se măsoară densitatea optică conform indicațiilor de mai sus cu o soluție martor care conține 5 ml de 4-DMAB și 5 ml de apă în care nu există uree. Se trasează curba de calibrare. 6. Calculul rezultatelor Se determină cantitatea de uree din eșantion cu ajutorul curbei de calibrare. Rezultatul se exprimă în mg de uree per kg eșantion. 7. Evaluarea metodei 7.1. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească: — La 420 nm — 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg;	

A fost organizat un exercițiu de comparare interlaboratoare la nivelul UE, la care au participat 18 laboratoare. Au fost analizate cinci eşantioane pozitive de furaje combinate pentru rumegătoare (în tabelele 1 și 2, denumite MAT) (1 analiză) în duplicate oarbe, în timp ce un furaj combinat de rumegătoare martor a fost analizat o singură dată.

Calculule pentru limitele de repetabilitate (r) și reproductibilitate (R), astfel cum sunt definite în orientările internaționale, au fost efectuate după eliminarea valorilor excepționale utilizând analiza varianței valorilor valabile.

Cifrele privind performanța calculată a metodei (repetabilitate, reproductibilitate) sunt prezentate în tabelele următoare. Pentru toate eşantioanele testate, inclusiv materialul martor, nu au fost găsite rezultate fals pozitive sau fals negative.

MAT 2	MA T 5	MA T 3	MA T 4	MA T 6	
	Ovi ne	Bovi ne	Ovi ne	Ovi ne	Bov ine
Fracție masică țintă (mg kg ⁻¹)	3 00 0	5 00 0	7 00 1	9 03 6	11 0 00
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 24 1	6 99 3	7 83 0	9 96 2	12 0 71
Deviația standard a reproductibilității s _R (mg kg ⁻¹)	1 14 1	1 30 3	985	994	1 71 1

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 7 000 mg/kg;

— 20 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 7 000 mg/kg sau mai mult.

— La 435 nm

— 40 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 5 000 mg/kg;

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 5 000 mg/kg și sub 9 000 mg/kg;

— 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 9 000 mg/kg sau mai mult.

7.2. Reproductibilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eşantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească:

— La 420 nm

— 3 000 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de uree de 12 000 mg/kg sau mai mult.

— La 435 nm

— 50 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree situat între 3 000 mg/kg și sub 8 000 mg/kg;

— 25 % din valoarea superioară, pentru un conținut de uree de 8 000 mg/kg sau mai mult.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

A fost organizat un exercițiu de comparare interlaboratoare la nivelul UE, la care au participat 18 laboratoare. Au fost analizate cinci eşantioane pozitive de furaje combinate pentru rumegătoare (în tabelele 1 și 2, denumite MAT) (1 analiză) în duplicate oarbe, în timp ce un furaj combinat de rumegătoare martor a fost analizat o singură dată.

Calculule pentru limitele de repetabilitate (r) și reproductibilitate (R), astfel cum sunt definite în orientările

Deviația standard a repetabilității s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Deviația standard relativă a reproductibilității RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Deviația standard relativă a repetabilității RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limita reproductibilității, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 19 5	3 64 9	2 75 9	2 78 4	4 79 0
Limita repetabilității, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 02 4	1 68 4	1 53 6	1 99 4	2 06 4

Tabelul 1
Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la $\lambda = 420$ nm în toate materialele

Tabelul 2
Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la $\lambda = 435$ nm în toate materialele

MAT 2	MA T 5	MA T 3	MA T 4	MA T 6	
	Ovi ne	Bovi ne	Ovi ne	Ovi ne	Bov ine

internaționale, au fost efectuate după eliminarea valorilor excepționale utilizând analiza varianței valorilor valabile. Cifrele privind performanța calculată a metodei (repetabilitate, reproductibilitate) sunt prezentate în tabelele următoare. Pentru toate eșantioanele testate, inclusiv materialul martor, nu au fost găsite rezultate fals pozitive sau fals negative.

Tabelul 1
Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la $\lambda = 420$ nm în toate materialele

	MA T 2	MA T 5	MA T 3	MA T 4	MA T 6
	Ovi ne	Bov ine	Ovi ne	Ovi ne	Bov ine
Fracție masică țintă (mg kg ⁻¹)	3 0 00	5 0 00	7 0 01	9 0 36	11 000
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 2 41	6 9 93	7 8 30	9 9 62	12 071
Deviația standard a reproductibilității s_R (mg kg ⁻¹)	1 1 41	1 3 03	985	994	1 7 11
Deviația standard a repetabilității s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Deviația standard relativă a reproductibilității RSD_R (%)	27	19	13	10	14

Fracție masică țință (mg kg ⁻¹)	3 00 0	5 00 0	7 00 1	9 03 6	11 0 00
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 10 1	6 46 7	7 89 0	10 0 62	11 6 42
Deviația standard a reproductibilității s _R (mg kg ⁻¹)	706	1 19 4	675	745	1 37 8
Deviația standard a repetabilității s _r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Deviația standard relativă a reproductibilității RSD _R (%)	17	18	9	7	12
Deviația standard relativă a repetabilității RSD _r (%)	14	10	8	2	1
Limita reproductibilității, R [R = 2,8 × s _R]	1 97 7	3 34 4	1 88 9	2 08 7	3 85 9
Limita repetabilității, r [r = 2,8 × s _r]	1 59 6	1 75 9	1 71 5	549	467

9. *Observații*

cazul unui conținut de uree care depășește 3 %, se reduce greutatea eșantionului la 1 g sau se diluează soluția inițială astfel încât să nu fie mai mult de 50 mg de uree în 500 ml.

cazul unui conținut mic în uree, se crește greutatea eșantionului atâta timp cât filtratul rămâne transparent și incolor.

Deviația standard relativă a repetabilității RSD _r (%)	17	9	7	7	6
Limita reproductibilității, R [R = 2,8 × s _R]	3 1 95	3 6 49	2 7 59	2 7 84	4 7 90
Limita repetabilității, r [r = 2,8 × s _r]	2 0 24	1 6 84	1 5 36	1 9 94	2 0 64

Tabelul 2

Caracteristicile de performanță ale metodei pentru uree, măsurată la λ = 435 nm în toate materialele

MAT 2	MA T 5	MA T 3	MA T 4	MA T 6	
	Ovi ne	Bov ine	Ovi ne	Ovi ne	Bov ine
Fracție masică țință (mg kg ⁻¹)	3 0 00	5 0 00	7 0 01	9 0 36	11 000
Fracție masică medie. (mg kg ⁻¹)	4 1 01	6 4 67	7 8 90	10 062	11 642
Deviația standard a reproductibilității s _R (mg kg ⁻¹)	706	1 1 94	675	745	1 3 78
Deviația standard a repetabilității s _r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167

Rezultatele de mai sus obținute în urma studiilor colaborative nu indică o diferență semnificativă de precizie între ureea măsurată la 420 nm sau la 435 nm.

E. DETERMINAREA AMINOACIZILOR (CU EXCEPȚIA TRIPTOFANULUI)

Metodele de analiză utilizate pentru determinarea aminoacizilor (cu excepția triptofanului) sunt:
— EN ISO 13903 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de aminoacizi;
— EN ISO 17180 Hrană pentru animale – Determinarea lizinei, metioninei și treoninei în produsele comerciale de aminoacizi și în preamestecuri ([15](#));
— metoda de analiză descrisă la punctele 1-10 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea aminoacizilor liberi (sintetici și naturali) și totali (legați în peptide și liberi) din materii prime furajere, furaje combinate și preamestecuri care conțin mai puțin de 10 % ([16](#)) din fiecare aminoacid, folosind un analizator de aminoacizi. Ea este aplicabilă 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 deosebește diferite săruri ale 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

Deviația standard relativă a reproductibilității RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Deviația standard relativă a repetabilității RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limita reproductibilității, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 9 77	3 3 44	1 8 89	2 0 87	3 8 59
Limita repetabilității, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 5 96	1 7 59	1 7 15	549	467

9. Observații

9.1. În cazul unui conținut de uree care depășește 3 %, se reduce greutatea eșantionului la 1 g sau se diluează soluția inițială astfel încât să nu fie mai mult de 50 mg de uree în 500 ml.

9.2. În cazul unui conținut mic în uree, se crește greutatea eșantionului atâta timp cât filtratul rămâne transparent și incolor.

9.3. Rezultatele de mai sus obținute în urma studiilor colaborative nu indică o diferență semnificativă de precizie între ureea măsurată la 420 nm sau la 435 nm.

E. DETERMINAREA AMINOACIZILOR (CU EXCEPȚIA TRIPTOFANULUI)

Metodele de analiză utilizate pentru determinarea aminoacizilor (cu excepția triptofanului) sunt:
— SM SR EN ISO 13903:2012 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de aminoacizi;
— SM EN ISO 17180:2016 Hrană pentru animale – Determinarea lizinei, metioninei și treoninei în produsele comerciale de aminoacizi și în preamestecuri ([15](#));
— metoda de analiză descrisă la punctele 1-10 de mai jos.

2.1. Aminoacizi liberi Aminoacizii liberi se extrag cu acid clorhidric diluat. Macromoleculele azotate coextrase se precipită cu acid sulfosalicilic și se îndepărtează prin filtrare. Soluția filtrată se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni 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 hidrolizate de eșantioane neoxidate. Toți ceilalți aminoacizi enumerați la punctul 1 (Obiectiv și domeniu de aplicare) se pot determina fie în eșantionul oxidat, fie în eșantionul neoxidat. Oxidarea se realizează la 0 °C cu ajutorul unui amestec de acid performic și fenol. Reactivul de oxidare în exces se descompune cu disulfid de sodiu. Eșantionul oxidat sau neoxidat se hidrolizează cu acid clorhidric (punctul 3.20) timp de 23 de ore. Hidrolizatul se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni și se determină prin reacție cu ninhidrină folosind detecția fotometrică la 570 nm (440 nm pentru prolină). 3. Reactivi Trebuie utilizată apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS). id de hidrogen, g (g/g) = 30 %. formic, g (g/g) = 98-100 %. it de sodiu.	1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea aminoacizilor liberi (sintetici și naturali) și totali (legați în peptide și liberi) din materii prime furajere, furaje combinate și preamestecuri care conțin mai puțin de 10 % (¹⁶) din fiecare aminoacid, folosind un analizator de aminoacizi. Ea este aplicabilă 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 deosebește diferite săruri ale aminoacizilor și nu permite diferențierea între formele D și L ale aminoacizilor. Ea nu este valabilă pentru determinarea triptofanului sau a analogilor hidroxiilați ai aminoacizilor. 2. Principiu 2.1. Aminoacizi liberi Aminoacizii liberi se extrag cu acid clorhidric diluat. Macromoleculele azotate coextrase se precipită cu acid sulfosalicilic și se îndepărtează prin filtrare. Soluția filtrată se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni 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 hidrolizate de eșantioane neoxidate. Toți ceilalți aminoacizi enumerați la punctul 1 (Obiectiv și domeniu de aplicare) se pot determina fie în eșantionul oxidat, fie în eșantionul neoxidat. Oxidarea se realizează la 0 °C cu ajutorul unui amestec de acid performic și fenol. Reactivul de oxidare în exces se descompune cu disulfid de sodiu. Eșantionul oxidat sau neoxidat se hidrolizează cu acid clorhidric (punctul 3.20)	

xid de sodiu. 5-sulfosalicilic dihidrat. clorhidric, cu densitate de aproximativ 1,18 g/ml. trisodic dihidrat. odietanol (tiodiglicol). ură de sodiu. idrină. de petrol, interval de fierbere 40-60 °C. eucină sau alt compus adecvat pentru a fi utilizat ca etalon intern. , gaz (< 10 ppm oxigen). tanol. noacizi. bstanțele standard ale aminoacizilor enumerați la punctul 1 (Obiect și domeniu de aplicare). Compuși puri care nu conțin deloc apă de cristalizare. Înainte de utilizare, se usucă în vid cu ajutorul P₂O₅ sau al H₂SO₄, timp de 1 săptămână. id cisteic. etionin sulfonă. ție de hidroxid de sodiu, c = 7,5 mol/l: Se dizolvă 300 g de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru. ție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l: Se dizolvă 40 g de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru. ție de acid formic-fenol: Se amestecă 889 g de acid formic (punctul 3.2) cu 111 g de apă și se adaugă 4,73 g de fenol (punctul 3.3). ură de hidroliză, c = 6 mol HCl/l conținând 1 g de fenol/l: Se adaugă 1 g de fenol (punctul 3.3) la 492 ml de HCl (punctul 3.7) și se completează cu apă până la 1 litru.	timp de 23 de ore. Hidrolizatul se ajustează la pH-ul de 2,20. Aminoacizii se separă prin cromatografie cu schimb de ioni și se determină prin reacție cu ninhidrină folosind detecția fotometrică la 570 nm (440 nm pentru prolină). 3. Reactivi Trebuie utilizată apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS). 3.1. Peroxid de hidrogen, g (g/g) = 30 %. 3.2. Acid formic, g (g/g) = 98-100 %. 3.3. Fenol. 3.4. Disulfid de sodiu. 3.5. Hidroxid de sodiu. 3.6. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat. 3.7. Acid clorhidric, cu densitate de aproximativ 1,18 g/ml. 3.8. Citrat trisodic dihidrat. 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 a fi utilizat ca etalon intern. 3.14. Azot, gaz (< 10 ppm oxigen). 3.15. 1-octanol. 3.16. Aminoacizi. 3.16.1. Substanțele standard ale aminoacizilor enumerați la punctul 1 (Obiect și domeniu de aplicare). Compuși puri care nu conțin deloc apă de cristalizare. Înainte de utilizare, se usucă în vid cu ajutorul P₂O₅ sau al H₂SO₄, timp de 1 săptămână. 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 de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru.	

ură de extracție, c = 0,1 mol HCl/l conținând 2 % tiodiglicol: se iau 8,2 ml de HCl (punctul 3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml de apă, se adaugă 20 ml de tiodiglicol (punctul 3.9) și se completează cu apă până la 1 litru (nu se amestecă direct 3.7 și 3.9). 5-sulfosalicilic dihidrat, β = 6 %: Se dizolvă 60 g de acid 5-sulfosalicilic (punctul 3.6) în apă și se completează cu apă până la 1 litru. ură de oxidare (acid performic-fenol): Se amestecă 0,5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.1) cu 4,5 ml soluție de acid formic-fenol (punctul 3.19) într-un mic pahar de laborator. Se incubează la 20-30 °C timp de 1 oră pentru a se forma acid performic, apoi se răcește în baie de apă cu gheață (15 min) înainte de a se adăuga la eșantion. Atenție: a se evita contactul cu pielea și a se purta îmbrăcăminte protectoare. ție tampon de citrat, c = 0,2 mol Na⁺/l, pH 2,20: Se dizolvă 19,61 g de citrat de sodiu (punctul 3.8), 5 ml de tiodiglicol (punctul 3.9), 1 g de fenol (punctul 3.3) și 16,50 ml de HCl (punctul 3.7) în aproximativ 800 ml de apă. Se ajustează pH-ul la 2,20. Se completează cu apă până la 1 litru. ții tampon de eluție, preparate în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9). tiv ninhidrină, preparat în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9). ții etalon de aminoacizi. Aceste soluții se păstrează la o temperatură sub 5 °C. luție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.16.1). c = 2,5 μmol/ml pentru fiecare, în acid clorhidric. Se pot obține din surse comerciale.	3.18. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l: Se dizolvă 40 g de NaOH (punctul 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 (punctul 3.2) cu 111 g de apă și se adaugă 4,73 g de fenol (punctul 3.3). 3.20. Mixtură de hidroliză, c = 6 mol HCl/l conținând 1 g de fenol/l: Se adaugă 1 g de fenol (punctul 3.3) la 492 ml de HCl (punctul 3.7) și se completează cu apă până la 1 litru. 3.21. Mixtură de extracție, c = 0,1 mol HCl/l conținând 2 % tiodiglicol: se iau 8,2 ml de HCl (punctul 3.7), se diluează cu aproximativ 900 ml de apă, se adaugă 20 ml de tiodiglicol (punctul 3.9) și se completează cu apă până la 1 litru (nu se amestecă direct 3.7 și 3.9). 3.22. Acid 5-sulfosalicilic dihidrat, β = 6 %: Se dizolvă 60 g de acid 5-sulfosalicilic (punctul 3.6) în apă și se completează cu apă până la 1 litru. 3.23. Mixtură de oxidare (acid performic-fenol): Se amestecă 0,5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.1) cu 4,5 ml soluție de acid formic-fenol (punctul 3.19) într-un mic pahar de laborator. Se incubează la 20-30 °C timp de 1 oră pentru a se forma acid performic, apoi se răcește în baie de apă cu gheață (15 min) înainte de a se adăuga la eșantion. Atenție: a se evita contactul cu pielea și a se purta îmbrăcăminte protectoare. 3.24. Soluție tampon de citrat, c = 0,2 mol Na⁺/l, pH 2,20: Se dizolvă 19,61 g de citrat de sodiu (punctul 3.8), 5 ml de tiodiglicol (punctul 3.9), 1 g de fenol (punctul 3.3) și 16,50 ml de HCl (punctul 3.7) în aproximativ 800 ml de apă. Se ajustează pH-ul la 2,20. Se completează cu apă până la 1 litru. 3.25. Soluții tampon de eluție, preparate în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9).		

luție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$. Se dizolvă 0,2115 g de acid cisteic (punctul 3.16.2) și 0,2265 g de metionin sulfonă (punctul 3.16.3) în soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat de 1 litru și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat. Se păstrează la o temperatură sub 5°C, nu mai mult de 12 luni. Această soluție nu se utilizează dacă soluția etalon stoc (punctul 3.27.1) conține acid cisteic și metionin sulfonă. luție etalon stoc de etalon intern, de exemplu, norleucină, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$. Se dizolvă 0,6560 g de norleucină (punctul 3.13) în soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat și se completează cu soluție tampon de citrat până la 250 ml. Se păstrează la o temperatură sub 5°C, nu mai mult de 6 luni. luție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ de acid cisteic și metionin sulfonă și $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ din ceilalți aminoacizi. Se dizolvă 2,2 g de clorură de sodiu (punctul 3.10) într-un pahar de laborator de 100 ml care conține 30 ml soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se adaugă 4,00 ml de soluție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.27.1), 4,00 ml soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă (punctul 3.27.2) și 0,50 ml soluție etalon stoc de etalon intern (punctul 3.27.3), dacă este cazul. Se ajustează pH-ul la valoarea 2,20 cu hidroxid de sodiu (punctul 3.18). Se transferă cantitativ într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) și se amestecă. Se păstrează la o temperatură sub 5°C, nu mai mult de 3 luni.	3.26. Reactiv ninhidrină, preparat în conformitate cu condițiile pentru analizorul utilizat (punctul 4.9). 3.27. Soluții etalon de aminoacizi. Aceste soluții se păstrează la o temperatură sub 5°C. 3.27.1. Soluție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.16.1). $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ pentru fiecare, în acid clorhidric. Se pot obține din surse comerciale. 3.27.2. Soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$. Se dizolvă 0,2115 g de acid cisteic (punctul 3.16.2) și 0,2265 g de metionin sulfonă (punctul 3.16.3) în soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat de 1 litru și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat. Se păstrează la o temperatură sub 5°C, nu mai mult de 12 luni. Această soluție nu se utilizează dacă soluția etalon stoc (punctul 3.27.1) conține acid cisteic și metionin sulfonă. 3.27.3. Soluție etalon stoc de etalon intern, de exemplu, norleucină, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$. Se dizolvă 0,6560 g de norleucină (punctul 3.13) în soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat și se completează cu soluție tampon de citrat până la 250 ml. Se păstrează la o temperatură sub 5°C, nu mai mult de 6 luni. 3.27.4. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ de acid cisteic și metionin sulfonă și $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ din ceilalți aminoacizi. Se dizolvă 2,2 g de clorură de sodiu (punctul 3.10) într-un pahar de laborator de 100 ml care conține 30 ml soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se adaugă 4,00 ml de soluție etalon stoc de aminoacizi (punctul 3.27.1), 4,00 ml soluție etalon stoc de acid cisteic și metionin sulfonă (punctul 3.27.2) și 0,50 ml soluție etalon stoc de etalon intern (punctul 3.27.3), dacă este cazul. Se ajustează pH-ul la valoarea 2,20 cu hidroxid de sodiu (punctul 3.18).		

A se vedea și observațiile de la punctul 9.1. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate preparată în conformitate cu punctul 5.3.3.1 și pentru utilizare cu extracte (punctul 5.2). Soluția de calibrare se prepară în conformitate cu punctul 3.27.4, dar omițând clorura de sodiu. Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni. 4. Aparatură Balon cu fund rotund de 100 sau 250 ml dotat cu un condensator cu reflux. Sticlă din borosilicat, de 100 ml, cu un dop filetat cu căptușeală de cauciuc/teflon (de exemplu, Duran, Schott) pentru utilizare în cuptor. Cuptor cu ventilație forțată și un regulator de temperatură cu precizie mai mare de ± 2 °C. pH-metru (cu trei zecimale). Filtru cu membrană (0,22 μm). Centrifugă. Evaporator rotativ cu vid. Agitator mecanic sau magnetic. Analizor de aminoacizi sau echipament HPLC cu coloană schimbătoare de ioni, dispozitiv pentru ninhidrină, derivare post-coloană și detector fotometric. Coloana este umplută cu rășini de polistiren sulfonat capabile să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. Fluxul din liniile cu soluție tampon și ninhidrină este asigurat de pompe care au o stabilitate a fluxului de $\pm 0,5$ % în perioada care include atât funcționarea în vederea calibrării standardului, cât și analiza eșantionului.	Se transferă cantitativ într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) și se amestecă. Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni. A se vedea și observațiile de la punctul 9.1. 3.27.5. Soluție de calibrare a aminoacizilor standard pentru utilizare cu hidrolizate preparată în conformitate cu punctul 5.3.3.1 și pentru utilizare cu extracte (punctul 5.2). Soluția de calibrare se prepară în conformitate cu punctul 3.27.4, dar omițând clorura de sodiu. Se păstrează la o temperatură sub 5 °C, nu mai mult de 3 luni. 4. Aparatură 4.1. Balon cu fund rotund de 100 sau 250 ml dotat cu un condensator cu reflux. 4.2. Sticlă din borosilicat, de 100 ml, cu un dop filetat cu căptușeală de cauciuc/teflon (de exemplu, Duran, Schott) pentru utilizare în cuptor. 4.3. Cuptor cu ventilație forțată și un regulator de temperatură cu precizie mai mare de ± 2 °C. 4.4. pH-metru (cu trei zecimale). 4.5. Filtru cu membrană (0,22 μm). 4.6. Centrifugă. 4.7. Evaporator rotativ cu vid. 4.8. Agitator mecanic sau magnetic. 4.9. Analizor de aminoacizi sau echipament HPLC cu coloană schimbătoare de ioni, dispozitiv pentru ninhidrină, derivare post-coloană și detector fotometric. Coloana este umplută cu rășini de polistiren sulfonat capabile să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. Fluxul din liniile cu soluție tampon și ninhidrină este asigurat de pompe care au o stabilitate a fluxului de $\pm 0,5$ % în perioada care include atât funcționarea în vederea calibrării standardului, cât și analiza eșantionului.		

În cazul unor analizori de aminoacizi se pot utiliza proceduri de hidrolizare în care hidrolizatul are o concentrație de sodiu de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ și conține întreaga cantitate de acid formic rezidual din etapa de oxidare. Alți analizori nu oferă o separare satisfăcătoare a anumitor aminoacizi dacă hidrolizatul conține exces de acid formic și/sau concentrații mari 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 se face sub vid, la o temperatură maximă de 40 °C. 5. Procedura 5.1. Pregătirea eșantionului Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.12) înainte de măcinare. 5.2. Determinarea aminoacizilor liberi Se cântărește cu o abatere de 0,2 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer și se adaugă 100,0 ml de extract de mixtură (punctul 3.21). Se agită mixtura timp de 60 de minute cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (punctul 4.8). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator de 100 ml. Se adaugă 5,0 ml de soluție de acid sulfosalicilic (punctul 3.22) în cursul agitării și se continuă agitarea cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 5 minute. Se filtrează sau se centrifughează	În cazul unor analizori de aminoacizi se pot utiliza proceduri de hidrolizare în care hidrolizatul are o concentrație de sodiu de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ și conține întreaga cantitate de acid formic rezidual din etapa de oxidare. Alți analizori nu oferă o separare satisfăcătoare a anumitor aminoacizi dacă hidrolizatul conține exces de acid formic și/sau concentrații mari 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 se face sub vid, la o temperatură maximă de 40 °C. 5. Procedura 5.1. Pregătirea eșantionului Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.12) înainte de măcinare. 5.2. Determinarea aminoacizilor liberi Se cântărește cu o abatere de 0,2 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer și se adaugă 100,0 ml de extract de mixtură (punctul 3.21). Se agită mixtura timp de 60 de minute cu ajutorul agitatorului mecanic sau magnetic (punctul 4.8). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator de 100 ml. Se adaugă 5,0 ml de soluție de acid sulfosalicilic (punctul 3.22) în cursul agitării și se continuă agitarea cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 5 minute. Se filtrează sau se centrifughează supernatantul pentru a se îndepărta orice precipitat. Se introduc 10,0 ml din soluția rezultată într-un pahar de laborator de 100 ml și se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18), se transferă într-un balon gradat de volum adecvat	

supernatantul pentru a se îndepărta orice precipitat. Se introduc 10,0 ml din soluția rezultată într-un pahar de laborator de 100 ml și se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18), se transferă într-un balon gradat de volum adecvat utilizându-se soluție tampon de citrat (punctul 3.24) și se completează până la semn cu soluția tampon (punctul 3.24). Dacă se utilizează etalon intern, se adaugă 1,00 ml de etalon intern (punctul 3.27.3) pentru fiecare 100 ml de soluție finală și se completează până la semn cu soluție tampon (punctul 3.24). Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4. Dacă extractele nu se examinează în aceeași zi, trebuie păstrate la o temperatură sub 5 °C. 5.3. Determinarea aminoacizilor totali 5.3.1. Oxidare Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g de eșantion preparat (punctul 5.1) într-un (într-o): — balon cu fund rotund de 100 ml (punctul 4.1) pentru hidroliză în mediu deschis (punctul 5.3.2.3); sau — balon cu fund rotund de 250 ml (punctul 4.1) dacă este necesară o concentrație mică de sodiu (punctul 5.3.3.1); sau — sticlă de 100 ml dotată cu un dop filetat (punctul 4.2) (pentru hidroliză în mediu închis 5.3.2.4). Porția de eșantion cântărită are un conținut de azot de aproximativ 10 mg și un conținut de umiditate de maximum 100 mg. Se introduce balonul/sticla într-o baie de apă cu gheață și se răcește la 0 °C, se adaugă 5 ml de mixtură de oxidare (punctul 3.23) și se amestecă cu ajutorul unei spatule de sticlă cu vârf încovoiat. Se etanșeizează balonul/sticla conținând spatula cu	utilizându-se soluție tampon de citrat (punctul 3.24) și se completează până la semn cu soluția tampon (punctul 3.24). Dacă se utilizează etalon intern, se adaugă 1,00 ml de etalon intern (punctul 3.27.3) pentru fiecare 100 ml de soluție finală și se completează până la semn cu soluție tampon (punctul 3.24). Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4. Dacă extractele nu se examinează în aceeași zi, trebuie păstrate la o temperatură sub 5 °C. 5.3. Determinarea aminoacizilor totali 5.3.1. Oxidare Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g de eșantion preparat (punctul 5.1) într-un (într-o): — balon cu fund rotund de 100 ml (punctul 4.1) pentru hidroliză în mediu deschis (punctul 5.3.2.3); sau — balon cu fund rotund de 250 ml (punctul 4.1) dacă este necesară o concentrație mică de sodiu (punctul 5.3.3.1); sau — sticlă de 100 ml dotată cu un dop filetat (punctul 4.2) (pentru hidroliză în mediu închis 5.3.2.4). Porția de eșantion cântărită are un conținut de azot de aproximativ 10 mg și un conținut de umiditate de maximum 100 mg. Se introduce balonul/sticla într-o baie de apă cu gheață și se răcește la 0 °C, se adaugă 5 ml de mixtură de oxidare (punctul 3.23) și se amestecă cu ajutorul unei spatule de sticlă cu vârf încovoiat. Se etanșeizează balonul/sticla conținând spatula cu ajutorul unei pelicule ermetizante, se introduce baia de apă cu gheață conținând recipientul etanșeizat într-un frigider la 0 °C și se lasă timp de 16 ore. După 16 ore, se scoate din frigider, iar excesul de reactiv de oxidare se descompune prin adăugarea a 0,84 g de disulfid de sodiu (punctul 3.4). Se trece la 5.3.2.1. 5.3.2. Hidroliza 5.3.2.1. Hidroliza eșantioanelor oxidate	

ajutorul unei pelicule ermetizante, se introduce baia de apă cu gheață conținând recipientul etanșeizat într-un frigider la 0 °C și se lasă timp de 16 ore. După 16 ore, se scoate din frigider, iar excesul de reactiv de oxidare se descompune prin adăugarea a 0,84 g de disulfid de sodiu (punctul 3.4). Se trece la 5.3.2.1. 5.3.2. Hidroliza Hidroliza eșantioanelor oxidate La eșantioanele oxidate preparate în conformitate cu punctul 5.3.1 se adaugă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) având grijă să se spele orice reziduu de eșantion de pe pereții vasului și de pe spatulă. În funcție de procedura de hidrolizare utilizată, se trece la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4. Hidroliza eșantioanelor neoxidate Se cântăresc 0,1-1 g de eșantion preparat (punctul 5.1), cu o abatere de 0,2 mg, fie într-un balon cu fund rotund de 100 ml sau 250 ml (punctul 4.1), fie într-o sticlă de 100 ml dotată cu dop filetat (punctul 4.2). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă cu grijă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) și se amestecă cu eșantionul. Se procedează ca la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4. Hidroliza în mediu deschis Se adaugă 3 mărgelile de sticlă în mixtura din balon (preparată conform mențiunilor de la punctul 5.3.2.1 sau 5.3.2.2) și se fierbe în clocot continuu sub reflux timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se spală condensatorul cu 5 ml de soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se deconectează balonul și se răcește într-o baie de apă cu gheață.	La eșantioanele oxidate preparate în conformitate cu punctul 5.3.1 se adaugă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) având grijă să se spele orice reziduu de eșantion de pe pereții vasului și de pe spatulă. În funcție de procedura de hidrolizare utilizată, se trece la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4. 5.3.2.2. Hidroliza eșantioanelor neoxidate Se cântăresc 0,1-1 g de eșantion preparat (punctul 5.1), cu o abatere de 0,2 mg, fie într-un balon cu fund rotund de 100 ml sau 250 ml (punctul 4.1), fie într-o sticlă de 100 ml dotată cu dop filetat (punctul 4.2). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă cu grijă 25 ml de mixtură de hidroliză (punctul 3.20) și se amestecă cu eșantionul. Se procedează ca la punctul 5.3.2.3 sau 5.3.2.4. 5.3.2.3. Hidroliza în mediu deschis Se adaugă 3 mărgelile de sticlă în mixtura din balon (preparată conform mențiunilor de la punctul 5.3.2.1 sau 5.3.2.2) și se fierbe în clocot continuu sub reflux timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se spală condensatorul cu 5 ml de soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se deconectează balonul și se răcește într-o baie de apă cu gheață. Se procedează ca la punctul 5.3.3. 5.3.2.4. Hidroliza în mediu închis Sticla conținând mixtura preparată conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2 se introduce în cuptor (punctul 4.3) la 110 °C. În timpul primei ore, pentru a se preveni o creștere progresivă a presiunii (datorată expansiunii substanțelor gazoase) și pentru a se evita o explozie, se plasează dopul filetat la nivelul extremității superioare a vasului. A nu se închide vasul cu dopul respectiv. După o oră, se închide vasul cu dopul respectiv și se lasă în cuptor (punctul 4.3) timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se îndepărtează sticla din cuptor, se scoate cu grijă dopul de la nivelul sticlei, iar	

Se procedează ca la punctul 5.3.3. hidroliza în mediu închis Sticla conținând mixtura preparată conform punctului 5.3.2.1 sau 5.3.2.2 se introduce în cuptor (punctul 4.3) la 110 °C. În timpul primei ore, pentru a se preveni o creștere progresivă a presiunii (datorată expansiunii substanțelor gazoase) și pentru a se evita o explozie, se plasează dopul filetat la nivelul extremității superioare a vasului. A nu se închide vasul cu dopul respectiv. După o oră, se închide vasul cu dopul respectiv și se lasă în cuptor (punctul 4.3) timp de 23 de ore. La încheierea hidrolizei, se îndepărtează sticla din cuptor, se scoate cu grijă dopul de la nivelul sticlei, iar aceasta se introduce într-o baie de apă cu gheață. Se lasă să se răcească. În funcție de procedura de ajustare a pH-ului (punctul 5.3.3), se transferă cantitativ conținutul sticlei într-un pahar de laborator de 250 ml sau într-un balon cu fund rotund de 250 ml, utilizând soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se procedează ca la punctul 5.3.3. 5.3.3. Ajustarea pH-ului În funcție de toleranța la sodiu a analizorului de aminoacizi (punctul 4.9), pentru ajustarea pH-ului se procedează ca la punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2. Pentru sistemele cromatografice (punctul 4.9) necesitând o concentrație de sodiu mică. Este recomandabil să se utilizeze o soluție etalon stoc internă (punctul 3.27.3) în cazul în care se folosesc analizori de aminoacizi necesitând o concentrație mică de sodiu (în cazul în care volumul de acid trebuie redus).	aceasta se introduce într-o baie de apă cu gheață. Se lasă să se răcească. În funcție de procedura de ajustare a pH-ului (punctul 5.3.3), se transferă cantitativ conținutul sticlei într-un pahar de laborator de 250 ml sau într-un balon cu fund rotund de 250 ml, utilizând soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se procedează ca la punctul 5.3.3. 5.3.3. Ajustarea pH-ului În funcție de toleranța la sodiu a analizorului de aminoacizi (punctul 4.9), pentru ajustarea pH-ului se procedează ca la punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2. 5.3.3.1. Pentru sistemele cromatografice (punctul 4.9) necesitând o concentrație de sodiu mică. Este recomandabil să se utilizeze o soluție etalon stoc internă (punctul 3.27.3) în cazul în care se folosesc analizori de aminoacizi necesitând o concentrație mică de sodiu (în cazul în care volumul de acid trebuie redus). În acest caz, la hidrolizat se adaugă 2,00 ml de soluție etalon stoc internă (punctul 3.27.3) înainte de evaporare. La hidrolizatul obținut conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se adaugă 2 picături de 1-octanol (punctul 3.15). Utilizând un evaporator rotativ (punctul 4.7) se reduce volumul la 5-10 ml în condiții de vid la 40 °C. Dacă volumul este redus accidental la mai puțin de 5 ml, hidrolizatul trebuie aruncat, iar analiza trebuie repetată. Se ajustează pH-ul la 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18) și se procedează ca la punctul 5.3.4. 5.3.3.2. Pentru toți ceilalți analizori de aminoacizi (punctul 4.9) Hidrolizatele obținute conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se neutralizează parțial prin adăugarea cu grijă, în condiții de agitare continuă, a 17 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.17), asigurându-se că temperatura este menținută sub 40 °C.		

În acest caz, la hidrolizat se adaugă 2,00 ml de soluție etalon stoc internă (punctul 3.27.3) înainte de evaporare. La hidrolizatul obținut conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se adaugă 2 picături de 1-octanol (punctul 3.15). Utilizând un evaporator rotativ (punctul 4.7) se reduce volumul la 5-10 ml în condiții de vid la 40 °C. Dacă volumul este redus accidental la mai puțin de 5 ml, hidrolizatul trebuie aruncat, iar analiza trebuie repetată. Se ajustează pH-ul la 2,20 cu ajutorul soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18) și se procedează ca la punctul 5.3.4. tru toți ceilalți analizori de aminoacizi (punctul 4.9) Hidrolizatele obținute conform punctului 5.3.2.3 sau 5.3.2.4 se neutralizează parțial prin adăugarea cu grijă, în condiții de agitare continuă, a 17 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.17), asigurându-se că temperatura este menținută sub 40 °C. Se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 la temperatura camerei prin utilizarea soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.17) și în cele din urmă a soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18). Se trece la punctul 5.3.4. 5.3.4. Soluția de eșantion pentru cromatografie Se transferă cantitativ hidrolizatul cu pH ajustat (punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2) cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat de 200 ml și se completează până la semn cu soluție tampon (punctul 3.24). Dacă nu s-a utilizat deja un etalon intern, se adaugă 2,00 ml de etalon intern (punctul 3.27.3) și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24).	Se ajustează pH-ul la valoarea de 2,20 la temperatura camerei prin utilizarea soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.17) și în cele din urmă a soluției de hidroxid de sodiu (punctul 3.18). Se trece la punctul 5.3.4. 5.3.4. Soluția de eșantion pentru cromatografie Se transferă cantitativ hidrolizatul cu pH ajustat (punctul 5.3.3.1 sau 5.3.3.2) cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) într-un balon gradat de 200 ml și se completează până la semn cu soluție tampon (punctul 3.24). Dacă nu s-a utilizat deja un etalon intern, se adaugă 2,00 ml de etalon intern (punctul 3.27.3) și se completează până la semn cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se amestecă minuțios. Se trece la etapa cromatografică (punctul 5.4). Dacă soluțiile de eșantion nu se examinează în aceeași zi, ele se păstrează la o temperatură sub 5 °C. 5.4. Cromatografia Înainte de cromatografie se aduce extractul (punctul 5.2) sau hidrolizatul (punctul 5.3.4) la temperatura camerei. Se agită mixtura și se filtrează o cantitate potrivită printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,22 μm (punctul 4.5). Soluția limpede rezultată se supune cromatografiei prin schimb ionic, utilizând un analizor de aminoacizi (punctul 4.9). Injectarea poate fi efectuată manual sau automat. Este important ca aceeași cantitate de soluție ± 0,5 % să fie adăugată în coloană pentru analizarea etaloanelor și a eșantioanelor cu excepția situațiilor în care se utilizează un etalon intern și ca raporturile sodiu:aminoacizi în soluțiile de etalon și în cele de eșantion să fie cât mai similare posibil. În general, frecvența manevrelor de calibrare depinde de stabilitatea reactivului ninhidrină și a sistemului analitic. Etalonul sau eșantionul se diluează cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) pentru a genera o arie a vârfului pentru	

cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24). Se amestecă minuțios.

Se trece la etapa cromatografică (punctul 5.4).

Dacă soluțiile de eșantion nu se examinează în aceeași zi, ele se păstrează la o temperatură sub 5 °C.

5.4. *Cromatografia*

Înainte de cromatografie se aduce extractul (punctul 5.2) sau hidrolizatul (punctul 5.3.4) la temperatura camerei. Se agită mixtura și se filtrează o cantitate potrivită printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,22 μm (punctul 4.5). Soluția limpede rezultată se supune cromatografiei prin schimb ionic, utilizând un analizor de aminoacizi (punctul 4.9).

Injectarea poate fi efectuată manual sau automat. Este important ca aceeași cantitate de soluție ± 0,5 % să fie adăugată în coloană pentru analizarea etaloanelor și a eșantioanelor cu excepția situațiilor în care se utilizează un etalon intern și ca raporturile sodiu:aminoacizi în soluțiile de etalon și în cele de eșantion să fie cât mai similare posibil.

În general, frecvența manevrelor de calibrare depinde de stabilitatea reactivului ninhidrină și a sistemului analitic. Etalonul sau eșantionul se diluează cu soluție tampon de citrat (punctul 3.24) pentru a genera o arie a vârfului pentru etalon de 30-200 % din aria vârfului pentru eșantionul de aminoacid.

Cromatografia aminoacizilor va varia ușor în funcție de tipul analizorului și de rășina utilizate. Sistemul ales trebuie să fie capabil să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic generează un răspuns linear la modificările cantităților de aminoacizi adăugați la coloană.

etalon de 30-200 % din aria vârfului pentru eșantionul de aminoacid.

Cromatografia aminoacizilor va varia ușor în funcție de tipul analizorului și de rășina utilizate. Sistemul ales trebuie să fie capabil să separe aminoacizii unul de altul, precum și de materiale care conțin ninhidrină. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic generează un răspuns linear la modificările cantităților de aminoacizi adăugați la coloană.

În cursul etapei cromatografice se aplică rapoartele înălțimii corespunzătoare punctului minim:vârfului menționate mai jos, în cazul în care se analizează o soluție echimolară (de aminoacizi analizați). Această soluție echimolară trebuie să conțină cel puțin 30 % din cantitatea maximă de aminoacizi care poate fi măsurată cu precizie cu ajutorul sistemului analizor de aminoacizi (punctul 4.9).

Pentru separarea treoninei-serinei, în cazul suprapunerii a doi aminoacizi, raportul punct minim/vârf corespunzător aminoacidului situat mai jos pe cromatogramă nu trebuie să depășească 2:10. [dacă se determină doar cist(e)ina, metionina, treonina și lizina, separarea insuficientă a vârfurilor învecinate va influența în mod negativ determinarea]. Pentru toți ceilalți aminoacizi, separarea trebuie să fie mai bună de 1:10.

Sistemul trebuie să asigure că lizina se separă de „artefactele de lizină” și de ornitină.

6. *Calculul rezultatelor*

Aria vârfului pentru eșantion și etalon se măsoară pentru fiecare aminoacid în parte, iar cantitatea (X) se calculează în g de aminoacid per kg de eșantion.

$$X = \frac{A_c M V}{B m 1000}$$

Dacă se utilizează un etalon intern

se multiplică cu:

În cursul etapei cromatografice se aplică rapoartele înălțimii corespunzătoare punctului minim:vârfului menționate mai jos, în cazul în care se analizează o soluție echimolară (de aminoacizi analizați). Această soluție echimolară trebuie să conțină cel puțin 30 % din cantitatea maximă de aminoacizi care poate fi măsurată cu precizie cu ajutorul sistemului analizor de aminoacizi (punctul 4.9).

Pentru separarea treoninei-serinei, în cazul suprapunerii a doi aminoacizi, raportul punct minim/vârf corespunzător aminoacidului situat mai jos pe cromatogramă nu trebuie să depășească 2:10. [dacă se determină doar cist(e)ina, metionina, treonina și lizina, separarea insuficientă a vârfurilor învecinate va influența în mod negativ determinarea]. Pentru toți ceilalți aminoacizi, separarea trebuie să fie mai bună de 1:10.

Sistemul trebuie să asigure că lizina se separă de „artefactele de lizină” și de ornitină.

6. Calculul rezultatelor

Aria vârfului pentru eșantion și etalon se măsoară pentru fiecare aminoacid în parte, iar cantitatea (X) se calculează în g de aminoacid per kg de eșantion.

$$X = \frac{A_c M V}{B_m 1000}$$

Dacă se utilizează un etalon intern

se multiplică cu:

$$\frac{D}{C_A} = \text{aria vârfului, hidrolizat sau extract}$$

B = aria vârfului, soluția etalon de calibrare

C = aria vârfului, etalon intern în hidrolizat sau extract

$$\frac{D}{C_A} = \text{aria vârfului, hidrolizat sau extract}$$

B = aria vârfului, soluția etalon de calibrare

C = aria vârfului, etalon intern în hidrolizat sau extract

D = aria vârfului, etalon intern, soluția etalon de calibrare

M = greutatea molară a aminoacidului determinat

c = concentrația de standard în μmol/ml

m = greutatea eșantionului (g) (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat sau degresat)

V = total hidrolizat în ml (punctul 5.3.4) sau volumul de diluție total calculat pentru extract, în ml (6.1)

Cistina și cisteina se determină amândouă ca acid cisteic în hidrolizate de eșantion oxidat, dar se calculează ca cistină (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol) folosind M 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

Metionina se determină ca metionin sulfonă în hidrolizate de eșantion oxidat, dar se calculează ca metionină folosind M pentru metionină: 149,21 g/mol.

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

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

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

=volumul extractului final

V

7. Evaluarea metodei

Metoda a fost testată prin comparații la nivel internațional în 1990 utilizând patru furaje diferite (furaje combinate pentru porcine, furaje combinate pentru pui de carne, concentrate proteice, preamestecuri).

D=aria vârfului, etalon intern, soluția etalon de calibrare M= greutatea molară a aminoacidului determinat c = concentrația de standard în μmol/ml n=greutatea eşantionului (g) (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat sau degresat) V=total hidrolizat în ml (punctul 5.3.4) sau volumul de diluție total calculat pentru extract, în ml (6.1) Cistina și cisteina se determină amândouă ca acid cisteic în hidrolizate de eşantion oxidat, dar se calculează ca cistină (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol) folosind M 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol). Metionina se determină ca metionin sulfonă în hidrolizate de eşantion oxidat, dar se calculează ca metionină folosind M pentru metionină: 149,21 g/mol. Metionina liberă adăugată se determină după extracție ca metionină, pentru calculare folosindu-se aceeași M. Volumul total de diluție al extractelor (F) pentru determinarea aminoacizilor liberi (punctul 5.2) se calculează după cum urmează: $F = \frac{100 \text{ ml} (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \frac{V}{10}$ =volumul extractului final 7. <i>Evaluarea metodei</i> Metoda a fost testată prin comparații la nivel internațional în 1990 utilizând patru furaje diferite (furaje combinate pentru porcine, furaje combinate pentru pui de carne, concentrate proteice, preamestecuri). Metoda a fost testată în cadrul unui al doilea studiu de comparare interlaboratoare la nivel internațional în 2003 utilizând perechi	<i>Notă:</i> Metoda a fost testată în cadrul unui al doilea studiu de comparare interlaboratoare la nivel internațional în 2003 utilizând perechi de duplicate oarbe pe eşantioane de furaje de finisare pentru pui de carne, furaje starter pentru pui de carne, porumb, făină de peşte şi făină de păsări de curte. Pentru detalii, a se vedea SM SR EN ISO 13903:2012. Rezultatele studiului de comparare interlaboratoare din 1990, după eliminarea valorilor extreme, exprimate ca medie şi deviație standard sunt prezentate în tabelele de la acest punct: Medii în g/kg <table><tr><th rowspan="2">Material de referință</th><th colspan="4">Aminoacid</th></tr><tr><th>Treoni nă</th><th>Cist(e)i nă</th><th>Metioni nă</th><th>Lizi nă</th></tr><tr><td>Furaje mixte pentru porcine</td><td>6,94 n = 15</td><td>3,01 n = 17</td><td>3,27 n = 17</td><td>9,55 n = 13</td></tr><tr><td>Furaj combinat pentru pui de carne</td><td>9,31 n = 16</td><td>3,92 n = 18</td><td>5,08 n = 18</td><td>13,93 n = 16</td></tr><tr><td>Concentrat proteic</td><td>22,32 n = 16</td><td>5,06 n = 17</td><td>12,01 n = 17</td><td>47,74 n = 15</td></tr></table>	Material de referință	Aminoacid				Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă	Furaje mixte pentru porcine	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13	Furaj combinat 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		
Material de referință	Aminoacid																										
	Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă																							
Furaje mixte pentru porcine	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13																							
Furaj combinat 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																							

de duplicate oarbe pe eşantioane de furaje de finisare pentru pui de carne, furaje starter pentru pui de carne, porumb, făină de peşte şi făină de păsări de curte. Pentru detalii, a se vedea EN ISO 13903.

Rezultatele studiului de comparare interlaboratoare din 1990, după eliminarea valorilor extreme, exprimate ca medie şi deviaţie standard sunt prezentate în tabelele de la acest punct:

Medii în g/kg

Material de referinţă	Aminoacid			
	Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă
Furaje mixte pentru porcine	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Furaj combinat 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

Preamestec	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16
n = număr de laboratoare participante				

7.1. Repetabilitate

Repetabilitatea exprimată ca „deviaţie standard intralaborator” a comparaţiei interlaboratoare din tabelul de mai sus este redată în tabelele de mai jos:

Coeficient de variaţie (%) pentru repetabilitate (CVr)

Material de referinţă	Aminoacid			
	Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă
Furaje mixte pentru porcine	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Furaj combinat 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

				n = 16	Preamestec	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16																															
n = număr de laboratoare participante					n = număr de laboratoare participante																																			
7.1. Repetabilitate Repetabilitatea exprimată ca „deviație standard intralaborator” a comparației interlaboratoare din tabelul de mai sus este redată în tabelele de mai jos: Coefficient de variație (%) pentru repetabilitate (CV_r) <table><tr><th rowspan="2">Material de referință</th><th colspan="4">Aminoacid</th></tr><tr><th>Treoni nă</th><th>Cist(e)i nă</th><th>Metioni nă</th><th>Lizi nă</th></tr><tr><td>Furaje mixte pentru porcine</td><td>1,9 n = 15</td><td>3,3 n = 17</td><td>3,4 n = 17</td><td>2,8 n = 13</td></tr><tr><td>Furaj combinat pentru pui de carne</td><td>2,1 n = 16</td><td>2,8 n = 18</td><td>3,1 n = 18</td><td>2,1 n = 16</td></tr><tr><td>Concentrat proteic</td><td>2,7 n = 16</td><td>2,6 n = 17</td><td>2,2 n = 17</td><td>2,4 n = 15</td></tr><tr><td>Preamestec</td><td>2,2</td><td>—</td><td>2,4</td><td>2,1</td></tr></table>					Material de referință	Aminoacid				Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă	Furaje mixte pentru porcine	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13	Furaj combinat 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	—	2,4	2,1							
Material de referință	Aminoacid																																							
	Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă																																				
Furaje mixte pentru porcine	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13																																				
Furaj combinat 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	—	2,4	2,1																																				

	n = 16		n = 16	n = 16					
n = număr de laboratoare participante									
7.2. Reproductibilitate Rezultatele pentru deviația standard interlaboratoare pentru comparația interlaboratoare menționată mai sus sunt prezentate în tabelul de mai jos: Coefficient de variație (%) pentru reproductibilitate (CV_R)					7.2. Reproductibilitate Rezultatele pentru deviația standard interlaboratoare pentru comparația interlaboratoare menționată mai sus sunt prezentate în tabelul de mai jos: Coefficient de variație (%) pentru reproductibilitate (CV_R)				
Material de referință	Aminoacid				Material de referință	Aminoacid			
	Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă		Treoni nă	Cist(e)i nă	Metioni nă	Lizi nă
Furaje mixte pentru porcine	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13	Furaje mixte pentru porcine	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Furaj combinat pentru pui de carne	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16	Furaj combinat 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	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	Preamestec	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7

				n = 16					n = 16		
n = număr de laboratoare participante					n = număr de laboratoare participante						
8. Utilizarea materialelor de referință Aplicarea corectă a metodei se verifică prin repetarea măsurătorilor pentru materialele de referință certificate, atunci când acestea sunt disponibile. Se recomandă calibrarea cu soluție de calibrare pentru aminoacid certificată. 9. Observații 9.1. Din cauza diferențelor dintre analizorii de aminoacizi, concentrațiile finale ale soluțiilor de calibrare pentru aminoacizii standard (a se vedea punctele 3.27.4 și 3.27.5) și pentru hidrolizat (a se vedea punctul 5.3.4) se consideră orientative. Intervalul răspunsului liniar al aparatului trebuie verificat pentru toți aminoacizii. Soluția etalon se diluează cu soluție tampon de citrat pentru a genera arii de vârf situate la mijlocul intervalului. 9.2. În cazul în care pentru analizarea hidrolizatelor se folosește aparatură de cromatografie lichidă de înaltă performanță, condițiile experimentale trebuie optimizate în conformitate cu recomandările fabricantului. 9.3. Prin aplicarea metodei la furajele combinate sau la preamestecurile care conțin peste 1 % clorură (concentrate, furaje minerale, furaje complementare) poate apărea o subestimare a metioninei, ceea ce necesită un tratament special. 10. Criterii de performanță Compilarea rezultatelor (cu excepția tirozinei) care provin din cele două studii colaborative (din 1990 raportate la punctul 7 de mai sus și din 2005 raportate în EN/ISO 13903) oferă					8. Utilizarea materialelor de referință Aplicarea corectă a metodei se verifică prin repetarea măsurătorilor pentru materialele de referință certificate, atunci când acestea sunt disponibile. Se recomandă calibrarea cu soluție de calibrare pentru aminoacid certificată. 9. Observații 9.1. Din cauza diferențelor dintre analizorii de aminoacizi, concentrațiile finale ale soluțiilor de calibrare pentru aminoacizii standard (a se vedea punctele 3.27.4 și 3.27.5) și pentru hidrolizat (a se vedea punctul 5.3.4) se consideră orientative. Intervalul răspunsului liniar al aparatului trebuie verificat pentru toți aminoacizii. Soluția etalon se diluează cu soluție tampon de citrat pentru a genera arii de vârf situate la mijlocul intervalului. 9.2. În cazul în care pentru analizarea hidrolizatelor se folosește aparatură de cromatografie lichidă de înaltă performanță, condițiile experimentale trebuie optimizate în conformitate cu recomandările fabricantului. 9.3. Prin aplicarea metodei la furajele combinate sau la preamestecurile care conțin peste 1 % clorură (concentrate, furaje minerale, furaje complementare) poate apărea o subestimare a metioninei, ceea ce necesită un tratament special. 10. Criterii de performanță Compilarea rezultatelor (cu excepția tirozinei) care provin din cele două studii colaborative (din 1990 raportate la						

următoarele criterii de repetabilitate și reproductibilitate. Este posibil ca valorile obținute din aceste două studii interlaboratoare să nu fie aplicabile altor intervale de concentrație și matrice decât cele date. 10.1. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească: — 6 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei, lizinei, prolinei, acidului glutamic, izoleucinei și histidinei; — 8 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul treoninei, fenilalaninei, metioninei, acidului aspartic și leucinei; — 10 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei și valinei; — 12 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul serinei; — 15 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei. 10.2. Reproductibilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească: — 15 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei și treoninei; — 20 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul lizinei, prolinei, fenilalaninei, metioninei și acidului aspartic; — 22 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul acidului glutamic și leucinei; — 27 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei;	punctul 7 de mai sus și din 2005 raportate în SM SR EN ISO 13903:2012) oferă următoarele criterii de repetabilitate și reproductibilitate. Este posibil ca valorile obținute din aceste două studii interlaboratoare să nu fie aplicabile altor intervale de concentrație și matrice decât cele date. 10.1. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în același laborator și de către același laborant nu trebuie să depășească: — 6 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei, lizinei, prolinei, acidului glutamic, izoleucinei și histidinei; — 8 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul treoninei, fenilalaninei, metioninei, acidului aspartic și leucinei; — 10 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei și valinei; — 12 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul serinei; — 15 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei. 10.2. Reproductibilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eșantion în laboratoare diferite și/sau efectuate de laboranți diferiți nu trebuie să depășească: — 15 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul glicinei, alaninei și treoninei; — 20 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul lizinei, prolinei, fenilalaninei, metioninei și acidului aspartic; — 22 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul acidului glutamic și leucinei; — 27 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul argininei;	

— 32 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul izoleucinei; — 35 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul valinei și serinei; — 40 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul histidinei; — 50 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei. F. DETERMINAREA TRIPTOFANULUI Metodele de analiză utilizate pentru determinarea triptofanului sunt: — EN ISO 13904 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de triptofan; — metoda de analiză descrisă la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea în furaje a triptofanului total și liber. Ea nu face distincție între formele D și L. 2. Principiu Pentru determinarea triptofanului total, eșantionul se hidrolizează în mediu bazic cu o soluție de hidroxid de bariu saturată și se încălzește la 110 °C timp de 20 de ore. După hidroliză, se adaugă etalon intern. Pentru determinarea triptofanului liber, eșantionul se extrage în mediu ușor acid în prezența etalonului intern. Triptofanul și etalonul intern din hidrolizat sau din extract se determină prin HPLC prin detectarea fluorescenței. 3. Reactivi 3.1. Se utilizează apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS/cm). 3.2. Substanță etalon: triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic. 3.3. Substanță etalon intern: α-metil-triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.	— 32 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul izoleucinei; — 35 % față de valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul valinei și serinei; — 40 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul histidinei; — 50 % în raport cu valoarea superioară, pentru aminoacizii totali în cazul cist(e)inei. F. DETERMINAREA TRIPTOFANULUI Metodele de analiză utilizate pentru determinarea triptofanului sunt: — SM EN ISO 13904:2016 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de triptofan; — metoda de analiză descrisă la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea în furaje a triptofanului total și liber. Ea nu face distincție între formele D și L. 2. Principiu Pentru determinarea triptofanului total, eșantionul se hidrolizează în mediu bazic cu o soluție de hidroxid de bariu saturată și se încălzește la 110 °C timp de 20 de ore. După hidroliză, se adaugă etalon intern. Pentru determinarea triptofanului liber, eșantionul se extrage în mediu ușor acid în prezența etalonului intern. Triptofanul și etalonul intern din hidrolizat sau din extract se determină prin HPLC prin detectarea fluorescenței. 3. Reactivi 3.1. Se utilizează apă dublu distilată sau apă de calitate echivalentă (conductivitate < 10 μS/cm). 3.2. Substanță etalon: triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic. 3.3. Substanță etalon intern: α-metil-triptofan (puritate/conținut ≥ 99 %), uscat sub vid pe pentoxid fosforic.	

3.4. Hidroxid de bariu octahidratat (se evită expunerea excesivă la aer a $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ pentru a se evita formarea de BaCO_3, care ar putea perturba determinarea) (a se vedea observația de la punctul 9.3). 3.5. Hidroxid de sodiu. 3.6. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 %. 3.7. Acid clorhidric, ρ_{20} 1,19 g/ml. 3.8. Metanol, de calitate HPLC. 3.9. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C. 3.10. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l Se dizolvă 40,0 g de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1). 3.11. Acid clorhidric, c = 6 mol/l: Se iau 492 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.12. Acid clorhidric, c = 1 mol/l: Se iau 82 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.13. Acid clorhidric, c = 0,1 mol/l: Se iau 8,2 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.14. Acid ortofosforic, c = 0,5 mol/l: Se iau 34 ml de acid ortofosforic (punctul 3.6) și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1). 3.15. Soluție concentrată de triptofan (punctul 3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$: Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2553 g de triptofan (punctul 3.2) în acid clorhidric (punctul 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la – 18 °C timp de maximum 4 săptămâni. 3.16. Soluție etalon intern concentrată, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$: Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2728 g de α-metil-triptofan (punctul 3.3) în acid clorhidric (punctul 3.13) și se	3.4. Hidroxid de bariu octahidratat (se evită expunerea excesivă la aer a $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ pentru a se evita formarea de BaCO_3, care ar putea perturba determinarea) (a se vedea observația de la punctul 9.3). 3.5. Hidroxid de sodiu. 3.6. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 %. 3.7. Acid clorhidric, ρ_{20} 1,19 g/ml. 3.8. Metanol, de calitate HPLC. 3.9. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C. 3.10. Soluție de hidroxid de sodiu, c = 1 mol/l Se dizolvă 40,0 g de NaOH (punctul 3.5) în apă și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1). 3.11. Acid clorhidric, c = 6 mol/l: Se iau 492 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.12. Acid clorhidric, c = 1 mol/l: Se iau 82 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.13. Acid clorhidric, c = 0,1 mol/l: Se iau 8,2 ml HCl (punctul 3.7) și se completează până la 1 litru cu apă. 3.14. Acid ortofosforic, c = 0,5 mol/l: Se iau 34 ml de acid ortofosforic (punctul 3.6) și se completează până la 1 litru cu apă (punctul 3.1). 3.15. Soluție concentrată de triptofan (punctul 3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$: Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2553 g de triptofan (punctul 3.2) în acid clorhidric (punctul 3.13) și se completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la – 18 °C timp de maximum 4 săptămâni. 3.16. Soluție etalon intern concentrată, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$: Într-un balon gradat de 500 ml se dizolvă 0,2728 g de α-metil-triptofan (punctul 3.3) în acid clorhidric (punctul 3.13)		

completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la – 18 °C timp de maximum 4 săptămâni. 3.17. Soluție etalon de calibrare pentru triptofan și etalon intern: Se iau 2,00 ml din soluția concentrată de triptofan (punctul 3.15) și 2,00 ml din soluția concentrată de etalon intern (α-metil-triptofan) (punctul 3.16). Se diluează cu apă (punctul 3.1) și metanol (punctul 3.8) până se ajunge la un volum aproximativ egal și la aproximativ aceeași concentrație de metanol (10-30 %) ca și hidrolizatul final. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. În timpul preparării se protejează de lumina solară directă. 3.18. Acid acetic 3.19. 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol. 3.20. Etanolamină g (g/g) > 98 %. 3.21. 1 g de soluție de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în 100 ml de metanol (punctul 3.8). 3.22. Fază mobilă pentru HPLC: 3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1). 4. Aparatură 4.1. Echipament de HPLC cu detector spectrofluorometric. 4.2. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 3 μm sau echivalent. 4.3. pH-metru. 4.4. Vas de polipropilenă, cu capacitate de 125 ml, cu gât larg și dop filetat. 4.5. Filtru cu membrană, 0,45 μm. 4.6. Autoclavă, 110 (± 2) °C, 1.4 (± 0,1) bar. 4.7. Agitator mecanic sau magnetic. 4.8. Mixer Vortex.	și se completează până la semn cu acid clorhidric (punctul 3.13). Se păstrează la – 18 °C timp de maximum 4 săptămâni. 3.17. Soluție etalon de calibrare pentru triptofan și etalon intern: Se iau 2,00 ml din soluția concentrată de triptofan (punctul 3.15) și 2,00 ml din soluția concentrată de etalon intern (α-metil-triptofan) (punctul 3.16). Se diluează cu apă (punctul 3.1) și metanol (punctul 3.8) până se ajunge la un volum aproximativ egal și la aproximativ aceeași concentrație de metanol (10-30 %) ca și hidrolizatul final. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. În timpul preparării se protejează de lumina solară directă. 3.18. Acid acetic 3.19. 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol. 3.20. Etanolamină g (g/g) > 98 %. 3.21. 1 g de soluție de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în 100 ml de metanol (punctul 3.8). 3.22. Fază mobilă pentru HPLC: 3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1). 4. Aparatură 4.1. Echipament de HPLC cu detector spectrofluorometric. 4.2. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 3 μm sau echivalent. 4.3. pH-metru. 4.4. Vas de polipropilenă, cu capacitate de 125 ml, cu gât larg și dop filetat. 4.5. Filtru cu membrană, 0,45 μm. 4.6. Autoclavă, 110 (± 2) °C, 1.4 (± 0,1) bar. 4.7. Agitator mecanic sau magnetic. 4.8. Mixer Vortex.	

5. Procedura 5.1. Prepararea eșantioanelor Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.9). 5.2. Determinarea triptofanului liber (extract) Se cântărește cu o abatere de 1 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer. Se adaugă 100,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.13) și 5,00 ml din soluția etalon intern concentrată (punctul 3.16). Se agită sau se amestecă timp de 60 de minute cu ajutorul unui agitator mecanic sau al unui amestecător magnetic (punctul 4.7). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator. Se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se ajustează pH-ul la valoarea 3 utilizând hidroxid de sodiu (punctul 3.10). Se adaugă suficient metanol (punctul 3.8) pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ același volum ca și soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)). Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4. Soluția etalon și extractele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea extractelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile. 5.3. Determinarea triptofanului total (hidrolizat)	5. Procedura 5.1. Prepararea eșantioanelor Eșantionul se macină astfel încât poate trece printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de umiditate trebuie fie uscate la aer la o temperatură de maximum 50 °C, fie liofilizate. Înainte de măcinare, eșantioanele cu un conținut ridicat de substanțe grase se extrag cu eter de petrol (punctul 3.9). 5.2. Determinarea triptofanului liber (extract) Se cântărește cu o abatere de 1 mg o cantitate adecvată (1-5 g) din eșantionul preparat (punctul 5.1), într-un flacon tip Erlenmeyer. Se adaugă 100,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.13) și 5,00 ml din soluția etalon intern concentrată (punctul 3.16). Se agită sau se amestecă timp de 60 de minute cu ajutorul unui agitator mecanic sau al unui amestecător magnetic (punctul 4.7). Se lasă să se decanteze sedimentul și se pipetează 10,0 ml din soluția supernatantă într-un pahar de laborator. Se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se ajustează pH-ul la valoarea 3 utilizând hidroxid de sodiu (punctul 3.10). Se adaugă suficient metanol (punctul 3.8) pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la un volum necesar pentru cromatografie (aproximativ același volum ca și soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)). Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4. Soluția etalon și extractele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea extractelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile. 5.3. Determinarea triptofanului total (hidrolizat)	

Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g din eșantionul preparat (punctul 5.1) într-un vas de polipropilenă (punctul 4.4). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă 8,4 g de hidroxid de bariu octahidrat (punctul 3.4) și 10 ml de apă. Se amestecă într-un mixer Vortex (punctul 4.8) sau într-un amestecător magnetic (punctul 4.7). Magnetul învelit în teflon se lasă în amestec. Se spală pereții vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul filetat și se închide vasul neermetic. Se transferă într-o autoclavă (punctul 4.6) cu apă clocotită și se expun la vapori de apă timp de 30-60 de minute. Se închide autoclava și se autoclavează la 110 (± 2) °C timp de 20 de ore. Înainte de a deschide autoclava se reduce temperatura la o valoare imediat sub 100 °C. Pentru a evita cristalizarea Ba(OH)₂·8 H₂O, se adaugă la amestecul cald 30 ml apă la temperatura camerei. Se agită sau se amestecă ușor. Se adaugă 2,00 ml din soluția etalon intern concentrată (α-metil-triptofan) (punctul 3.16). Se răcesc vasele într-o baie de apă/gheață timp de 15 minute. Apoi, se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se menține vasul în baia de răcire și se neutralizează cu HCl (punctul 3.11) amestecând continuu, apoi se ajustează pH-ul la valoarea 3,0 utilizând HCl (punctul 3.12). Se adaugă suficient metanol pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la volumul definit necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu provoacă precipitare. Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.	Se cântăresc cu o abatere de 0,2 mg între 0,1 și 1 g din eșantionul preparat (punctul 5.1) într-un vas de polipropilenă (punctul 4.4). Porția de eșantion cântărit trebuie să aibă un conținut de azot de aproximativ 10 mg. Se adaugă 8,4 g de hidroxid de bariu octahidrat (punctul 3.4) și 10 ml de apă. Se amestecă într-un mixer Vortex (punctul 4.8) sau într-un amestecător magnetic (punctul 4.7). Magnetul învelit în teflon se lasă în amestec. Se spală pereții vasului cu 4 ml de apă. Se pune dopul filetat și se închide vasul neermetic. Se transferă într-o autoclavă (punctul 4.6) cu apă clocotită și se expun la vapori de apă timp de 30-60 de minute. Se închide autoclava și se autoclavează la 110 (± 2) °C timp de 20 de ore. Înainte de a deschide autoclava se reduce temperatura la o valoare imediat sub 100 °C. Pentru a evita cristalizarea Ba(OH)₂·8 H₂O, se adaugă la amestecul cald 30 ml apă la temperatura camerei. Se agită sau se amestecă ușor. Se adaugă 2,00 ml din soluția etalon intern concentrată (α-metil-triptofan) (punctul 3.16). Se răcesc vasele într-o baie de apă/gheață timp de 15 minute. Apoi, se adaugă 5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.14). Se menține vasul în baia de răcire și se neutralizează cu HCl (punctul 3.11) amestecând continuu, apoi se ajustează pH-ul la valoarea 3,0 utilizând HCl (punctul 3.12). Se adaugă suficient metanol pentru a obține o concentrație de metanol în volumul final de 10-30 %. Se transferă într-un balon gradat de volum corespunzător și se diluează cu apă până la volumul definit necesar pentru cromatografie (de exemplu 100 ml). Adăugarea de metanol nu provoacă precipitare. Se filtrează câțiva ml de soluție printr-un filtru cu membrană cu orificii de 0,45 μm (punctul 4.5) înainte de a se injecta în coloana HPLC. Se trece la etapa de cromatografie conform punctului 5.4.	

Soluția etalon și hidrolizatele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea hidrolizatelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile. 5.4. Determinarea prin HPLC Următoarele condiții pentru eluția izocratică sunt oferite în scop orientativ; se pot aplica alte condiții cu condiția ca acestea să determine rezultate echivalente (a se vedea, de asemenea, observațiile de la punctele 9.1 și 9.2):		Soluția etalon și hidrolizatele se protejează de lumina solară directă. Dacă analizarea hidrolizatelor nu este posibilă în aceeași zi, ele pot fi depozitate la 5 °C, cel mult 3 zile. 5.4. Determinarea prin HPLC Următoarele condiții pentru eluția izocratică sunt oferite în scop orientativ; se pot aplica alte condiții cu condiția ca acestea să determine rezultate echivalente (a se vedea, de asemenea, observațiile de la punctele 9.1 și 9.2):			
Cromatografie lichidă coloană (punctul 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 3 μm sau echivalent	Cromatografie lichidă coloană (punctul 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 3 μm sau echivalent		
Temperatura coloanei:	Temperatura camerei	Temperatura coloanei:	Temperatura camerei		
Faza mobilă (punctul 3.22):	3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1)	Faza mobilă (punctul 3.22):	3,00 g acetic acid (punctul 3.18) + 900 ml apă (punctul 3.1) + 50,0 ml soluție (punctul 3.21) de 1,1,1-triclor-2-metil-2-propanol (punctul 3.19) în metanol (punctul 3.8) (1 g/100 ml). Se ajustează pH-ul la valoarea 5,00 utilizând etanolamină (punctul 3.20). Se completează până la 1 000 ml cu apă (punctul 3.1)		
Debit:	1 ml/min	Debit:	1 ml/min		
Timpul total de desfășurare:	aprox. 34 de minute	Timpul total de desfășurare:	aprox. 34 de minute		

Lungimea unde de detectie:	excitație: 280 nm, emisie: 356 nm.	Lungimea unde de detectie:	excitație: 280 nm, emisie: 356 nm.		
Volum de injecție	20 µl	Volum de injecție	20 µl		
6. Calculul rezultatelor Se calculează cantitatea de triptofan (X), în g per 100 g de eșantion. $X = \frac{A B V_1 c V_2 M}{C D V_3 10000 m}$ A E=suprafața vârfului pentru triptofan, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3) V=volumul în ml (2 ml) al soluției concentrate de triptofan 1 (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17) c=concentrația în µmol/ml (= 2,50) a soluției concentrate de triptofan (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17) V=volumul în ml al soluției etalon intern concentrate (punctul 2 3.16) adăugată la extract (punctul 5.2) (= 5,00 ml) sau la hidrolizat (punctul 5.3) (= 2,00 ml) C=aria vârfului etalonului intern, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3) D=aria vârfului pentru triptofan, soluția etalon de calibrare (punctul 3.17) V=volumul în ml (= 2,00 ml) al soluției de etalon intern 3 concentrate (punctul 3.16) adăugată la soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)		6. Calculul rezultatelor Se calculează cantitatea de triptofan (X), în g per 100 g de eșantion. $X = \frac{A B V_1 c}{C D V_3 1}$ A E=suprafața vârfului pentru triptofan, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3) V=volumul în ml (2 ml) al soluției concentrate de triptofan 1 (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17) c=concentrația în µmol/ml (= 2,50) a soluției concentrate de triptofan (punctul 3.15) adăugată la soluția de calibrare (punctul 3.17) V=volumul în ml al soluției etalon intern concentrate 2 (punctul 3.16) adăugată la extract (punctul 5.2) (= 5,00 ml) sau la hidrolizat (punctul 5.3) (= 2,00 ml) C=aria vârfului etalonului intern, extract (punctul 5.2) sau hidrolizat (punctul 5.3) D=aria vârfului pentru triptofan, soluția etalon de calibrare (punctul 3.17) V=volumul în ml (= 2,00 ml) al soluției de etalon intern 3 concentrate (punctul 3.16) adăugată la soluția etalon de calibrare (punctul 3.17)			

n=greutatea eşantionului în g (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat și/sau degresat)
M = masa molară a triptofanului (= 204,23 g/mol).

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eşantion nu trebuie să depășească 10 % din rezultatul cel mai mare.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a efectuat un studiu colaborativ la nivelul UE (a 4-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate trei eşantioane de către 12 laboratoare pentru a certifica metoda de hidroliză. Fiecare eşantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eşantion 1 Furaje pentru porcine	Eşantion 2 Furaje pentru porcine suplimentate cu L-triptofan	Eşantion 3 Furaje concentrate pentru porcine
L	12	12	12
n	50	55	50
Medie (g/kg)	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r (g/kg)	0,14	0,14	0,22

n=greutatea eşantionului în g (corectată pentru a obține greutatea originală dacă produsul este uscat și/sau degresat)

M = masa molară a triptofanului (= 204,23 g/mol).

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eşantion nu trebuie să depășească 10 % din rezultatul cel mai mare.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a efectuat un studiu colaborativ la nivelul UE (a 4-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate trei eşantioane de către 12 laboratoare pentru a certifica metoda de hidroliză. Fiecare eşantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Eşantion 1 Furaje pentru porcine	Eşantion 2 Furaje pentru porcine suplimentate cu L-triptofan	Eşantion 3 Furaje concentrate pentru porcine	
L	12	12	12
n	50	55	50
Medie (g/kg)	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r (g/kg)	0,14	0,14	0,22

CV _r [%]]	1,9	1,6	1,9	CV _r [%]	1,9	1,6	1,9		
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09	S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09		
R [g/kg]]	0,42	0,56	0,25	R [g/kg]	0,42	0,56	0,25		
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2	CV _R [%]	6,3	6,0	2,2		
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s_r = deviația standard a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %				L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s_r = deviația standard a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %					
S-a efectuat un alt studiu colaborativ la nivelul UE (a 3-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate două eșantioane de către 13 laboratoare pentru a certifica metoda de extracție a triptofanului liber. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:				S-a efectuat un alt studiu colaborativ la nivelul UE (a 3-a comparație interlaboratoare) în care au fost analizate două eșantioane de către 13 laboratoare pentru a certifica metoda de extracție a triptofanului liber. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:					

	Eșantion 4 Amestec de grâu cu soia	Eșantion 4 Amestec de grâu cu soia triptofan (0,457 g/kg)	Eșantion 4 Amestec de grâu cu soia	Eșantion 5 Amestec de grâu cu soia (= eșantion 4) adăugat cu triptofan (0,457 g/kg)						
L	12	12	L	12		12				
n	55	60					n	55		60
Medie (g/kg)	0,391	0,931								
s _r [g/kg]	0,005	0,012	s _r [g/kg]	0,005		0,012				
r (g/kg)	0,014	0,034	r (g/kg)	0,014		0,034				
CV _r [%]	1,34	1,34	CV _r [%]	1,34		1,34				
S _R [g/kg]	0,018	0,048	S _R [g/kg]	0,018		0,048				
R [g/kg]	0,050	0,134	R [g/kg]	0,050		0,134				
CV _R [%]	4,71	5,11	CV _R [%]	4,71		5,11				
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea testele Cochran, Dixon pentru extreme) s _r = deviația standard a repetabilității S _R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV _r = coeficientul de variație a repetabilității, %			L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s _r = deviația standard a repetabilității S _R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV _r = coeficientul de variație a repetabilității, %							

CV _R = coeficientul de variație a reproductibilității, %					CV _R = coeficientul de variație a reproductibilității, %			
S-a efectuat un alt studiu de comparație interlaboratoare la nivelul UE în care au fost analizate patru eșantioane de către 7 laboratoare cu scopul de a certifica metoda de hidroliză pentru triptofan. Rezultatele sunt prezentate mai jos. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize.					S-a efectuat un alt studiu de comparație interlaboratoare la nivelul UE în care au fost analizate patru eșantioane de către 7 laboratoare cu scopul de a certifica metoda de hidroliză pentru triptofan. Rezultatele sunt prezentate mai jos. Fiecare eșantion a fost supus la cinci analize.			
Eșantion 1 Furaje mixte pentru porcine (CRM 117)	Eșantion 2 Făină de pește cu conținut mic de grăsimi (CRM 118)	Eșanti on 3 Făină din soia (CRM 119)	Eșantion 4 Lapte praf degresat (CRM 120)		Eșantion 1 Furaje mixte pentru porcine (CRM 117)	Eșantion 2 Făină de pește cu conținut mic de grăsimi (CRM 118)		
L	7	7	7	7	L	7		
n	25	30	30	30	n	25		
Medie (g/kg)	2,064	8,801	6,882	5,236	Medie (g/kg)	2,064		
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040	s _r [g/kg]	0,021		
r (g/kg)	0,059	0,283	0,249	0,112	r (g/kg)	0,059		
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76	CV _r [%]	1,04		
					S _R [g/kg]	0,031		

S _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221	R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619	CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22	L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s _r = deviația standard a repetabilității S _R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV _r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV _R = coeficientul de variație a reproductibilității, %				
L = numărul de laboratoare care au transmis rezultate n = numărul de rezultate individuale reținute după eliminarea extremelor (identificate prin testele Cochran, Dixon pentru extreme) s _r = deviația standard a repetabilității S _R = deviația standard a reproductibilității r = repetabilitate R = reproductibilitate CV _r = coeficientul de variație a repetabilității, % CV _R = coeficientul de variație a reproductibilității, %					9. Observații 9.1. Respectarea următoarelor condițiile speciale de cromatografie poate conduce la o mai bună separare a triptofanului de α-metil-triptofan. Eluție izocratică urmată de curățarea coloanei prin gradient:				
9. Observații 9.1. Respectarea următoarelor condițiile speciale de cromatografie poate conduce la o mai bună separare a triptofanului de α-metil-triptofan. Eluție izocratică urmată de curățarea coloanei prin gradient:					Coloană pentru cromatografie lichidă: 125 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 μm sau echivalent				
Coloană pentru cromatografie lichidă: 125 mm × 4 mm, C ₁₈ , echivalent					Temperatura coloanei: 32 °C				
Temperatura coloanei: 32 °C					Fază mobilă: A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanol, 95 + 5 (V+V).				

Fază mobilă:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /meta		B: Metanol		
	B: Metanol	Programul gradientului:	0 min 100 % A	0 % B	
Programul gradientului:	0 min 100 % A		15 min 100 % A	0 % B	
	15 min 100 % A		17 min	60 % A 40 % B	
	17 min		19 min 60 % A	40 % B	
	19 min 60 % A		21 min 100 % A	0 % B	
	21 min 100 % A		33 min 100 % A	0 % B	
	33 min 100 % A	Debit:	1,2 ml/min		
Debit:	1,2 ml/min	Timpul total de desfășurare:	aproximativ 33 de minute		
Timpul total de desfășurare:	aproximativ 33 de minute				
9.2. Cromatografia variază în funcție de tipul de HPLC și de materialul utilizat la umplerea coloanei. Sistemul ales trebuie să fie capabil să stabilească o separare inițială de referință între triptofan și etalonul intern. În plus, este important ca produșii de degradare să fie bine separați de triptofan și de etalonul intern. Se efectuează o operație de probă pe hidrolizate fără etalon intern pentru a verifica prezența impurităților la nivelul liniei de bază corespunzătoare etalonului intern. Este important ca durata eluției pentru toți produșii de degradare să fie suficient de lungă, altfel prezența unor vârfuri de eluție întârziate poate interfera cu operațiile ulterioare de cromatografie. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic oferă un răspuns linear. Acest răspuns linear se măsoară în condiții de concentrație constantă (normalul) a etalonului intern și de		9.2. Cromatografia variază în funcție de tipul de HPLC și de materialul utilizat la umplerea coloanei. Sistemul ales trebuie să fie capabil să stabilească o separare inițială de referință între triptofan și etalonul intern. În plus, este important ca produșii de degradare să fie bine separați de triptofan și de etalonul intern. Se efectuează o operație de probă pe hidrolizate fără etalon intern pentru a verifica prezența impurităților la nivelul liniei de bază corespunzătoare etalonului intern. Este important ca durata eluției pentru toți produșii de degradare să fie suficient de lungă, altfel prezența unor vârfuri de eluție întârziate poate interfera cu operațiile ulterioare de cromatografie. În cursul operațiilor, sistemul cromatografic oferă un răspuns linear. Acest răspuns linear se măsoară în condiții de			

concentrații variabile a triptofanului. Este important că înălțimea vârfurilor pentru triptofan și pentru etalonul intern să se situeze în gama lineară a sistemului HPLC/fluorescență. Dacă vârfurile pentru triptofan și/sau pentru etalonul intern sunt prea joase sau prea înalte, analiza se repetă cu un eșantion de o altă dimensiune și/sau un volum final modificat. 9.3. Hidroxid de bariu Cu timpul, hidroxidul de bariu devine mai dificil de dizolvat. Aceasta generează o soluție lipsită de limpezime pentru determinarea HPLC, ceea ce poate duce la rezultate slabe pentru triptofan. G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ULEIURI ȘI GRĂSIMI BRUTE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Prezenta metodă este destinată determinării în furaje a conținutului de uleiuri și grăsimi brute. Utilizarea celor două proceduri descrise mai jos depinde de natura și compoziția furajului și de motivul efectuării analizei. Pentru determinarea uleiurilor și grăsimilor brute din semințele oleaginoase și din fructele oleaginoase, precum și din hrana pentru animale în care conținutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracția trebuie efectuată prin procedura A și reextracția prin procedura B (punctul 5.3). 1.1. Procedura A – Uleiuri și grăsimi brute care pot fi extrase direct Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine vegetală, cu excepția celor incluse în sfera de aplicare a procedurii B. 1.2. Procedura B – Uleiuri și grăsimi brute totale Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine animală și tuturor furajelor combinate. Ea trebuie folosită pentru toate materiile din care uleiurile și grăsimile nu pot fi extrase complet fără hidroliză prealabilă (de exemplu, gluten, drojdie, proteine din cartofi și produse supuse unor	concentrație constantă (normalul) a etalonului intern și de concentrații variabile a triptofanului. Este important că înălțimea vârfurilor pentru triptofan și pentru etalonul intern să se situeze în gama lineară a sistemului HPLC/fluorescență. Dacă vârfurile pentru triptofan și/sau pentru etalonul intern sunt prea joase sau prea înalte, analiza se repetă cu un eșantion de o altă dimensiune și/sau un volum final modificat. 9.3. Hidroxid de bariu Cu timpul, hidroxidul de bariu devine mai dificil de dizolvat. Aceasta generează o soluție lipsită de limpezime pentru determinarea HPLC, ceea ce poate duce la rezultate slabe pentru triptofan. G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE ULEIURI ȘI GRĂSIMI BRUTE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Prezenta metodă este destinată determinării în furaje a conținutului de uleiuri și grăsimi brute. Utilizarea celor două proceduri descrise mai jos depinde de natura și compoziția furajului și de motivul efectuării analizei. Pentru determinarea uleiurilor și grăsimilor brute din semințele oleaginoase și din fructele oleaginoase, precum și din hrana pentru animale în care conținutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracția trebuie efectuată prin procedura A și reextracția prin procedura B (punctul 5.3). 1.1. Procedura A – Uleiuri și grăsimi brute care pot fi extrase direct Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine vegetală, cu excepția celor incluse în sfera de aplicare a procedurii B. 1.2. Procedura B – Uleiuri și grăsimi brute totale Această metodă este aplicabilă materiilor prime furajere de origine animală și tuturor furajelor combinate. Ea trebuie	

procese cum ar fi extrudarea, transformarea în fulgi și încălzirea). 1.3. Interpretarea rezultatelor În toate cazurile în care se obține un rezultat superior folosind procedura B comparativ cu cel obținut prin folosirea procedurii A, rezultatul obținut prin procedura B se acceptă ca valoarea reală. 2. Principiu 2.1. Procedura A Eșantionul se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin distilare, iar reziduul se usucă și se cântărește. 2.2. Procedura B Eșantionul 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 procedura 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 mol/l 3.4. Agent de filtrare, de exemplu Kieselguhr, Hyflo-supercel. 4. Aparatură 4.1. Aparat de extracție. Dacă este dotat cu un sifon (aparatură Soxhlet), rata refluxului este astfel încât să producă aproximativ 10 cicluri pe oră; dacă aparatul este de tip fără sifon, rata refluxului este de aproximativ 10 ml pe minut. 4.2. Cartușe de extracție, lipsite de materie solubilă în eter de petrol și cu o porozitate compatibilă cu cerințele de la punctul 4.1. 4.3. Cuptor de uscare, fie cu vid reglat la 75 ± 3 °C, fie cu aer reglat la 100 ± 3 °C. 5. Procedura 5.1. Procedura A (a se vedea punctul 8.1)	folosită pentru toate materiile din care uleiurile și grăsimile nu pot fi extrase complet fără hidroliză prealabilă (de exemplu, gluten, drojdie, proteine din cartofi și produse supuse unor procese cum ar fi extrudarea, transformarea în fulgi și încălzirea). 1.3. Interpretarea rezultatelor În toate cazurile în care se obține un rezultat superior folosind procedura B comparativ cu cel obținut prin folosirea procedurii A, rezultatul obținut prin procedura B se acceptă ca valoarea reală. 2. Principiu 2.1. Procedura A Eșantionul se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin distilare, iar reziduul se usucă și se cântărește. 2.2. Procedura B Eșantionul 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 procedura 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 mol/l 3.4. Agent de filtrare, de exemplu Kieselguhr, Hyflo-supercel. 4. Aparatură 4.1. Aparat de extracție. Dacă este dotat cu un sifon (aparatură Soxhlet), rata refluxului este astfel încât să producă aproximativ 10 cicluri pe oră; dacă aparatul este de tip fără sifon, rata refluxului este de aproximativ 10 ml pe minut.	

Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, se transferă într-un cartuș de extracție (punctul 4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartușul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) și se extrage timp de șase ore cu eter de petrol (punctul 3.1). Se colectează extractul de eter de petrol într-un vas uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce (¹⁷). Solventul se îndepărtează prin distilare. Se usucă reziduul, păstrând vasul timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare (punctul 4.3). Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 de minute pentru a asigura că greutatea uleiurilor și grăsimilor rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg). 5.2. Procedura B Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (a se vedea punctul 8.2), se introduc într-un pahar de laborator de 400 ml sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric (punctul 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 flaconul tip Erlenmeyer. Se aduce amestecul la fierbere ușoară deasupra unei flăcări mici sau pe o plită și se păstrează în această stare 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 (punctul 3.4) suficientă pentru a evita orice pierdere de ulei și grăsime în timpul filtrării. Se filtrează printr-un filtru de hârtie dublă, umezită și lipsită de grăsimi. Se spală reziduul în apă rece până se obține un filtrat neutru. Se verifică filtratul ca să nu conțină deloc uleiuri și grăsimi. Prezența acestora indică faptul că eșantionul trebuie extras cu eter de petrol, folosind procedura A, înainte de hidroliză.	4.2. Cartușe de extracție, lipsite de materie solubilă în eter de petrol și cu o porozitate compatibilă cu cerințele de la punctul 4.1. 4.3. Cuptor de uscare, fie cu vid reglat la 75 ± 3 °C, fie cu aer reglat la 100 ± 3 °C. 5. Procedura 5.1. Procedura A (a se vedea punctul 8.1) Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, se transferă într-un cartuș de extracție (punctul 4.2) și se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartușul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) și se extrage timp de șase ore cu eter de petrol (punctul 3.1). Se colectează extractul de eter de petrol într-un vas uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce (¹⁷). Solventul se îndepărtează prin distilare. Se usucă reziduul, păstrând vasul timp de o oră și jumătate în cuptorul de uscare (punctul 4.3). Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. Se usucă din nou timp de 30 de minute pentru a asigura că greutatea uleiurilor și grăsimilor rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg). 5.2. Procedura B Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (a se vedea punctul 8.2), se introduc într-un pahar de laborator de 400 ml sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 300 ml și se adaugă 100 ml de acid clorhidric (punctul 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 flaconul tip Erlenmeyer. Se aduce amestecul la fierbere ușoară deasupra unei flăcări mici sau pe o plită și se păstrează în această stare 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 (punctul 3.4) suficientă pentru a evita orice pierdere de ulei	

Se aşază filtrul de hârtie dublă care conţine reziduul pe o sticlă de ceas şi se usucă timp de o oră şi jumătate în cuptorul cu aer (punctul 4.3) la 100 ± 3 °C. Se aşază filtrul de hârtie dublă care conţine reziduul uscat într-un cartuş de extracţie (punctul 4.2) şi se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartuşul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) şi se procedează astfel cum se indică la paragrafele doi şi trei de la punctul 5.1. 5.3. Procedura A şi reextragerea prin procedura B. Pentru determinarea uleiurilor şi grăsimilor brute din seminţele oleaginoase şi din fructele oleaginoase, precum şi din hrana pentru animale în care conţinutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracţia trebuie efectuată prin procedura A şi reextracţia prin procedura B. Aceasta înseamnă că, după extracţia cu eter de petrol (procedura A), reziduul sau o porţiune din reziduu se reextrage cu acid clorhidric (procedura B). Conţinutul de uleiuri şi de grăsimi brute este suma rezultatelor procedurilor A şi B. 6. Exprimarea rezultatului Greutatea reziduului se exprimă ca procent din eşantion. 7. Repetabilitate Diferenţa dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe acelaşi eşantion de către acelaşi laborant nu depăşeşte: — 0,2 % în valoare absolută, pentru un conţinut în uleiuri şi grăsimi brute mai mic de 5 %; — 4,0 % relativ la rezultatul cel mai mare pentru un conţinut cuprins între 5 şi 10 %; — 0,4 % în valoare absolută, pentru un conţinut mai mare de 10 %. 8. Observaţii	şi grăsimi în timpul filtrării. Se filtrează printr-un filtru de hârtie dublă, umezită şi lipsită de grăsimi. Se spală reziduul în apă rece până se obţine un filtrat neutru. Se verifică filtratul ca să nu conţină deloc uleiuri şi grăsimi. Prezenţa acestora indică faptul că eşantionul trebuie extras cu eter de petrol, folosind procedura A, înainte de hidroliză. Se aşază filtrul de hârtie dublă care conţine reziduul pe o sticlă de ceas şi se usucă timp de o oră şi jumătate în cuptorul cu aer (punctul 4.3) la 100 ± 3 °C. Se aşază filtrul de hârtie dublă care conţine reziduul uscat într-un cartuş de extracţie (punctul 4.2) şi se acoperă cu un tampon de vată lipsit de grăsimi. Cartuşul se introduce într-un extractor (punctul 4.1) şi se procedează astfel cum se indică la paragrafele doi şi trei de la punctul 5.1. 5.3. Procedura A şi reextragerea prin procedura B. Pentru determinarea uleiurilor şi grăsimilor brute din seminţele oleaginoase şi din fructele oleaginoase, precum şi din hrana pentru animale în care conţinutul de uleiuri/grăsimi este mai mare de 15 %, extracţia trebuie efectuată prin procedura A şi reextracţia prin procedura B. Aceasta înseamnă că, după extracţia cu eter de petrol (procedura A), reziduul sau o porţiune din reziduu se reextrage cu acid clorhidric (procedura B). Conţinutul de uleiuri şi de grăsimi brute este suma rezultatelor procedurilor A şi B. 6. Exprimarea rezultatului Greutatea reziduului se exprimă ca procent din eşantion. 7. Repetabilitate Diferenţa dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe acelaşi eşantion de către acelaşi laborant nu depăşeşte: — 0,2 % în valoare absolută, pentru un conţinut în uleiuri şi grăsimi brute mai mic de 5 %;	

8.1. Pentru produse cu un conținut mare de uleiuri și grăsimi, care sunt dificil de măcinat sau care sunt improprie prelevării unui eșantion de testare redus omogen, se procedează după cum urmează. Se cântăresc 20 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se amestecă cu o cantitate de 10 g sau mai mare de sulfat de sodiu anhidru (punctul 3.2). Se extrage cu eter de petrol (punctul 3.1) astfel cum se indică la punctul 5.1. Se completează extractul obținut până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.1) și se amestecă. Se iau 50 ml de soluție și se introduc într-un vas mic, uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce. Se elimină solventul prin distilare, se usucă și se procedează astfel cum se indică la ultimul paragraf al punctului 5.1. Se elimină solventul din reziduul de extracție rămas în cartuș, se macină reziduul până la o finețe de 1 mm, se reintroduce în cartușul de extracție (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se procedează astfel cum se indică la punctul 5.1, paragrafele doi și trei. Conținutul de uleiuri și grăsimi se calculează ca procent din eșantion folosind următoarea formulă: $(10 m_1 + m_2) \cdot 5$ unde: m=greutatea în grame a reziduului după prima extracție (parte 1 alicotă din extract); m 2 =greutatea în grame a reziduului după a doua extracție. 8.2. Pentru anumite produse (de exemplu, cu conținut mic de uleiuri și grăsimi) masa eșantionului de testat se poate mări. 8.3. Este posibil ca, înainte de hidroliză și extracție, hrana pentru animalele de companie cu conținut mare de apă să trebuiască să fie amestecată cu sulfat de sodiu anhidru, conform procedurii B.	— 4,0 % relativ la rezultatul cel mai mare pentru un conținut cuprins între 5 și 10 %; — 0,4 % în valoare absolută, pentru un conținut mai mare de 10 %. 8. Observații 8.1. Pentru produse cu un conținut mare de uleiuri și grăsimi, care sunt dificil de măcinat sau care sunt improprie prelevării unui eșantion de testare redus omogen, se procedează după cum urmează. Se cântăresc 20 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se amestecă cu o cantitate de 10 g sau mai mare de sulfat de sodiu anhidru (punctul 3.2). Se extrage cu eter de petrol (punctul 3.1) astfel cum se indică la punctul 5.1. Se completează extractul obținut până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.1) și se amestecă. Se iau 50 ml de soluție și se introduc într-un vas mic, uscat și cântărit, care conține fragmente de piatră ponce. Se elimină solventul prin distilare, se usucă și se procedează astfel cum se indică la ultimul paragraf al punctului 5.1. Se elimină solventul din reziduul de extracție rămas în cartuș, se macină reziduul până la o finețe de 1 mm, se reintroduce în cartușul de extracție (nu se adaugă sulfat de sodiu) și se procedează astfel cum se indică la punctul 5.1, paragrafele doi și trei. Conținutul de uleiuri și grăsimi se calculează ca procent din eșantion folosind următoarea formulă: $(10 m_1 + m_2) \cdot 5$ unde: m=greutatea în grame a reziduului după prima extracție 1 (parte alicotă din extract); m2=greutatea în grame a reziduului după a doua extracție. 8.2. Pentru anumite produse (de exemplu, cu conținut mic de uleiuri și grăsimi) masa eșantionului de testat se poate mări.	

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 ca timpul de uscare de 1,5 h să necesite a fi prelungit pentru unele furaje. Uscarea excesivă se evită, întrucât acest fapt poate determina rezultate slabe. Se poate folosi, de asemenea, un cuptor cu microunde. H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE FIBRE BRUTE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a substanțelor organice lipsite de grăsimi care sunt insolubile în mediu acid și alcalin și care sunt descrise în mod convențional ca fibre brute. Metoda nu se aplică în cazul lignocelulozei și al carbonului vegetal (particule prea fine). 2. Principiu Eșantionul, degresat la nevoie, se tratează succesiv cu soluții de acid sulfuric și hidroxid de potasiu, de concentrații specifice, în stare de fierbere. Reziduul se separă prin filtrare printr-un filtru de sticlă sinterizată spălat, uscat, cântărit și calcinat la o temperatură cuprinsă între 475 și 500 °C. Pierderea de greutate rezultată prin calcinare corespunde fibrelor brute din eşantionul testat. 3. Reactivi 3.1. Acid sulfuric, c = 0,13 mol/l. 3.2. Agent antispumant (de exemplu n-octanol). 3.3. Agent de filtrare (Celite 545 sau echivalent), încălzit la 500 °C timp de patru ore (8.6). 3.4. Acetonă. 3.5. Eter de petrol cu interval de fierbere între 40 și 60 °C. 3.6. Acid clorhidric, c = 0,5 mol/l. 3.7. Soluție de hidroxid de potasiu, c = 0,23 mol/l. 4. Aparatură 4.1. Unitate de încălzire pentru dizolvare cu acid sulfuric și soluție de hidroxid de potasiu, echipată cu un suport pentru	8.3. Este posibil ca, înainte de hidroliză și extracție, hrana pentru animalele de companie cu conținut mare de apă să trebuiască să fie amestecată cu sulfat de sodiu anhidru, conform procedurii 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 ca timpul de uscare de 1,5 h să necesite a fi prelungit pentru unele furaje. Uscarea excesivă se evită, întrucât acest fapt poate determina rezultate slabe. Se poate folosi, de asemenea, un cuptor cu microunde. H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE FIBRE BRUTE 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a substanțelor organice lipsite de grăsimi care sunt insolubile în mediu acid și alcalin și care sunt descrise în mod convențional ca fibre brute. Metoda nu se aplică în cazul lignocelulozei și al carbonului vegetal (particule prea fine). 2. Principiu Eșantionul, degresat la nevoie, se tratează succesiv cu soluții de acid sulfuric și hidroxid de potasiu, de concentrații specifice, în stare de fierbere. Reziduul se separă prin filtrare printr-un filtru de sticlă sinterizată spălat, uscat, cântărit și calcinat la o temperatură cuprinsă între 475 și 500 °C. Pierderea de greutate rezultată prin calcinare corespunde fibrelor brute din eşantionul testat. 3. Reactivi 3.1. Acid sulfuric, c = 0,13 mol/l. 3.2. Agent antispumant (de exemplu n-octanol). 3.3. Agent de filtrare (Celite 545 sau echivalent), încălzit la 500 °C timp de patru ore (8.6). 3.4. Acetonă. 3.5. Eter de petrol cu interval de fierbere între 40 și 60 °C.	

creuzetul filtrant (punctul 4.2) și dotată cu un tub de evacuare prevăzut cu un dop la orificiul de ieșire pentru lichide și de creare de vid, posibil și cu aer comprimat. Înainte de fiecare utilizare zilnică, unitatea se preîncălzește cu apă aflată în stare de fierbere, timp de 5 minute. 4.2. Creuzet filtrant de sticlă cu placă filtrantă de sticlă sinterizată fuzionată, cu pori de 40-90 μm. Înainte de prima utilizare se încălzește la 500 °C timp de câteva minute, iar apoi se răcește (8.6). 4.3. Cilindru de cel puțin 270 ml cu condensator cu reflux, care poate fi supus fierberii. 4.4. Cuptor de uscare, cu termostat. 4.5. Cuptor cu muflă, cu termostat. 4.6. Unitate de extracție compusă dintr-o placă de sprijin pentru creuzetul filtrant (punctul 4.2) și cu o țevă de evacuare prevăzută cu un dop la orificiul de creare de vid și de ieșire a lichidelor. 4.7. Inele de conectare utilizate pentru a asambla unitatea de încălzire (punctul 4.1), creuzetul (punctul 4.2) și cilindrul (punctul 4.3), precum și pentru a conecta unitatea de extracție la rece (punctul 4.6) cu creuzetul. 5. Procedura Se cântărește 1 g de eșantion preparat cu o abatere de 1 mg și se introduce în creuzet (punctul 4.2), (a se vedea observațiile 9.1, 9.2 și 9.3) și se adaugă 1 g de adjuvant de filtrare (punctul 3.3). Se assemblează unitatea de încălzire (punctul 4.1) și creuzetul filtrant (punctul 4.2), apoi se atașează cilindrul (punctul 4.3) la creuzet. Se toarnă 150 ml de acid sulfuric aflat în stare de fierbere (punctul 3.1) în ansamblul cilindru-creuzet și, dacă este necesar, se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2). Se aduce lichidul la fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute.	3.6. Acid clorhidric, $c = 0,5 \text{ mol/l}$. 3.7. Soluție de hidroxid de potasiu, $c = 0,23 \text{ mol/l}$. 4. Aparatură 4.1. Unitate de încălzire pentru dizolvare cu acid sulfuric și soluție de hidroxid de potasiu, echipată cu un suport pentru creuzetul filtrant (punctul 4.2) și dotată cu un tub de evacuare prevăzut cu un dop la orificiul de ieșire pentru lichide și de creare de vid, posibil și cu aer comprimat. Înainte de fiecare utilizare zilnică, unitatea se preîncălzește cu apă aflată în stare de fierbere, timp de 5 minute. 4.2. Creuzet filtrant de sticlă cu placă filtrantă de sticlă sinterizată fuzionată, cu pori de 40-90 μm. Înainte de prima utilizare se încălzește la 500 °C timp de câteva minute, iar apoi se răcește (8.6). 4.3. Cilindru de cel puțin 270 ml cu condensator cu reflux, care poate fi supus fierberii. 4.4. Cuptor de uscare, cu termostat. 4.5. Cuptor cu muflă, cu termostat. 4.6. Unitate de extracție compusă dintr-o placă de sprijin pentru creuzetul filtrant (punctul 4.2) și cu o țevă de evacuare prevăzută cu un dop la orificiul de creare de vid și de ieșire a lichidelor. 4.7. Inele de conectare utilizate pentru a asambla unitatea de încălzire (punctul 4.1), creuzetul (punctul 4.2) și cilindrul (punctul 4.3), precum și pentru a conecta unitatea de extracție la rece (punctul 4.6) cu creuzetul. 5. Procedura Se cântărește 1 g de eșantion preparat cu o abatere de 1 mg și se introduce în creuzet (punctul 4.2), (a se vedea observațiile 9.1, 9.2 și 9.3) și se adaugă 1 g de adjuvant de filtrare (punctul 3.3). Se assemblează unitatea de încălzire (punctul 4.1) și creuzetul filtrant (punctul 4.2), apoi se atașează cilindrul (punctul 4.3) la creuzet. Se toarnă 150 ml de acid sulfuric aflat în stare de		

Se deschide dopul țevii de evacuare (punctul 4.1) și, în condiții de vid, se filtrează acidul sulfuric prin creuzetul filtrant, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de 30 ml de apă aflată în stare de fierbere, asigurându-se că reziduul se filtrează uscat după fiecare spălare. Se închide dopul orificiului de evacuare și se toarnă 150 ml de soluție de hidroxid de potasiu aflată în stare de fierbere (punctul 3.7) în ansamblul cilindru-creuzet, apoi se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2). Se aduce lichidul la punctul de fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute. Se filtrează și se repetă procedura de spălare utilizată în etapa cu acid sulfuric. După spălarea și uscarea finală, se deconectează creuzetul împreună cu conținutul său și se reconectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6). Se creează vidul, iar reziduul se spală în creuzet cu trei porții consecutive de acetonă de 25 ml (punctul 3.4), asigurându-se că reziduul se filtrează în starea uscată după fiecare spălare. Creuzetul se usucă în cuptor la 130 °C până se ajunge la o greutate constantă. După fiecare uscare, se răcește în desicator și se cântărește rapid. Se introduce creuzetul într-un cuptor cu muflă și se calcinează până se atinge o greutate constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 2 mg) la o temperatură cuprinsă între 475 °C și 500 °C timp de cel puțin 30 de minute. După fiecare încălzire, înainte de cântărire se răcește mai întâi în cuptor, iar apoi în desicator. Se efectuează un test martor fără eșantion. Pierderea de greutate rezultată din calcinare nu trebui să depășească 4 mg. 6. <i>Calculul rezultatelor</i> Conținutul de fibre brute exprimat ca procent din eșantion este dat de formula:	fierbere (punctul 3.1) în ansamblul cilindru-creuzet și, dacă este necesar, se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2). Se aduce lichidul la fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute. Se deschide dopul țevii de evacuare (punctul 4.1) și, în condiții de vid, se filtrează acidul sulfuric prin creuzetul filtrant, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de 30 ml de apă aflată în stare de fierbere, asigurându-se că reziduul se filtrează uscat după fiecare spălare. Se închide dopul orificiului de evacuare și se toarnă 150 ml de soluție de hidroxid de potasiu aflată în stare de fierbere (punctul 3.7) în ansamblul cilindru-creuzet, apoi se adaugă câteva picături de agent antispumant (punctul 3.2). Se aduce lichidul la punctul de fierbere în decurs de 5 ± 2 minute și se fierbe viguros exact 30 de minute. Se filtrează și se repetă procedura de spălare utilizată în etapa cu acid sulfuric. După spălarea și uscarea finală, se deconectează creuzetul împreună cu conținutul său și se reconectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6). Se creează vidul, iar reziduul se spală în creuzet cu trei porții consecutive de acetonă de 25 ml (punctul 3.4), asigurându-se că reziduul se filtrează în starea uscată după fiecare spălare. Creuzetul se usucă în cuptor la 130 °C până se ajunge la o greutate constantă. După fiecare uscare, se răcește în desicator și se cântărește rapid. Se introduce creuzetul într-un cuptor cu muflă și se calcinează până se atinge o greutate constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 2 mg) la o temperatură cuprinsă între 475 °C și 500 °C timp de cel puțin 30 de minute. După fiecare încălzire, înainte de cântărire se răcește mai întâi în cuptor, iar apoi în desicator.	

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

unde:

m = greutatea eşantionului în g;

m₀ = pierderea de greutate după calcinare în cursul determinării, în g;

m₁ = pierderea de greutate după calcinare în cursul testului martor, în g.

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească:

—
0,6 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;

—
6 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

8. **Reproductibilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eşantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească:

—
1,0 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;

—
10 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

9. **Observații**

9.1. Furajele care au conținut de grăsimi brute mai mare de 10 % trebuie să fie degresate înainte de a fi supuse analizei cu eter de petrol (punctul 3.5). Creuzetul filtrant (punctul 4.2) împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6) și se creează vidul, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de eter de petrol de 30 ml,

Se efectuează un test martor fără eşantion. Pierderea de greutate rezultată din calcinare nu trebuie să depășească 4 mg.

6. **Calculul rezultatelor**

Conținutul de fibre brute exprimat ca procent din eşantion este dat de formula:

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

unde:

m = greutatea eşantionului în g;

m₀ = pierderea de greutate după calcinare în cursul determinării, în g;

m₁ = pierderea de greutate după calcinare în cursul testului martor, în g.

7. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească:

— 0,6 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;

— 6 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

8. **Reproductibilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate pe același eşantion în laboratoare diferite nu trebuie să depășească:

— 1,0 % în valoare absolută pentru un conținut de fibre brute mai mic de 10 %;

— 10 % relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fibre brute egal sau mai mare de 10 %.

9. **Observații**

9.1. Furajele care au conținut de grăsimi brute mai mare de 10 % trebuie să fie degresate înainte de a fi supuse analizei cu eter de petrol (punctul 3.5). Creuzetul filtrant (punctul 4.2) împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de

asigurându-se că reziduul este uscat. Creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de încălzire (punctul 4.1) și se continuă astfel cum se descrie la punctul 5. 9.2. Furajele care conțin grăsimi care nu pot fi extrase direct cu eter de petrol (punctul 3.5) trebuie degresate astfel cum se indică la punctul 8.1 și degresate încă o dată după fierbere cu acid. După fierbere cu acid și spălare consecutivă, creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6), apoi se spală de trei ori cu 30 ml acetonă, urmat de trei spălări suplimentare cu porții de eter de petrol de 30 ml. Se filtrează sub vid până la uscare, iar analizarea se continuă astfel cum se descrie la punctul 5, începând cu tratamentul cu hidroxid de potasiu. 9.3. Dacă furajul conține mai mult de 5 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu, se conectează creuzetul (punctul 4.2) împreună cu eșantionul cântărit la unitatea de încălzire (punctul 4.1). Eșantionul se spală de trei ori cu 30 ml acid clorhidric (punctul 3.6). După fiecare adăugare, se lasă eșantionul să stea timp de aproximativ un minut înainte de filtrare. Se spală o singură dată cu 30 ml apă, iar apoi se continuă astfel cum se descrie la punctul 5. 9.4. Dacă se utilizează aparatură în formă de stativ (o serie de creuzete atașate la aceeași unitate de încălzire) nu se efectuează două determinări individuale pe același eșantion de analizat în aceeași serie. 9.5. Dacă după fierbere este dificil să se filtreze soluțiile acide și alcaline, se utilizează aer comprimat introdus prin țeava de evacuare a unității de încălzire și apoi se continuă filtrarea. 9.6. Temperatura de calcinare nu depășește 500 °C pentru a se putea prelungi timpul de utilizare a sticlei creuzetului filtrant. Trebuie acordată atenție pentru a se evita șocurile termice excesive în cursul ciclurilor de încălzire și răcire. I. DETERMINAREA ZAHARURILOR 1. Obiectiv și domeniu de aplicare	extracție la rece (punctul 4.6) și se creează vidul, apoi se spală reziduul cu trei porții consecutive de eter de petrol de 30 ml, asigurându-se că reziduul este uscat. Creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de încălzire (punctul 4.1) și se continuă astfel cum se descrie la punctul 5. 9.2. Furajele care conțin grăsimi care nu pot fi extrase direct cu eter de petrol (punctul 3.5) trebuie degresate astfel cum se indică la punctul 8.1 și degresate încă o dată după fierbere cu acid. După fierbere cu acid și spălare consecutivă, creuzetul împreună cu conținutul său se conectează la unitatea de extracție la rece (punctul 4.6), apoi se spală de trei ori cu 30 ml acetonă, urmat de trei spălări suplimentare cu porții de eter de petrol de 30 ml. Se filtrează sub vid până la uscare, iar analizarea se continuă astfel cum se descrie la punctul 5, începând cu tratamentul cu hidroxid de potasiu. 9.3. Dacă furajul conține mai mult de 5 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu, se conectează creuzetul (punctul 4.2) împreună cu eșantionul cântărit la unitatea de încălzire (punctul 4.1). Eșantionul se spală de trei ori cu 30 ml acid clorhidric (punctul 3.6). După fiecare adăugare, se lasă eșantionul să stea timp de aproximativ un minut înainte de filtrare. Se spală o singură dată cu 30 ml apă, iar apoi se continuă astfel cum se descrie la punctul 5. 9.4. Dacă se utilizează aparatură în formă de stativ (o serie de creuzete atașate la aceeași unitate de încălzire) nu se efectuează două determinări individuale pe același eșantion de analizat în aceeași serie. 9.5. Dacă după fierbere este dificil să se filtreze soluțiile acide și alcaline, se utilizează aer comprimat introdus prin țeava de evacuare a unității de încălzire și apoi se continuă filtrarea. 9.6. Temperatura de calcinare nu depășește 500 °C pentru a se putea prelungi timpul de utilizare a sticlei creuzetului	

Această metodă permite determinarea cantității de zaharuri reductoare și a zaharurilor totale după inversie, exprimate ca glucoză sau, acolo unde este cazul, ca zaharoză, prin conversie cu factorul 0,95. Ea este aplicabilă furajelor combinate. Pentru alte tipuri de furaje există metode specifice. Dacă este necesar, lactoza se determină separat, ținându-se cont de aceasta la calcularea rezultatelor. Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de zahăr utilizat la calcularea valorii energetice a furajului. În cazul în care conținutul de zahăr trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză. 2. Principiu Zaharurile se extrag în etanol diluat; soluția se limpezește cu soluții Carrez I și II. După eliminarea etanolului, cantitățile pre- și post-inversie se determină prin metoda Luff-Schoorl. 3. Reactivi 3.1. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C, neutralizată cu fenolftaleină. 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Metiloranj, soluție 0,1 % (greutate/volum). 3.5. Acid clorhidric 4 mol/litru. 3.6. Acid clorhidric 0,1 mol/litru. 3.7. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru. 3.8. Reactiv Luff-Schoorl: Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.8.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.8.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.8.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează.	filtrant. Trebuie acordată atenție pentru a se evita șocurile termice excesive în cursul ciclurilor de încălzire și răcire. I. DETERMINAREA ZAHARURILOR 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea cantității de zaharuri reductoare și a zaharurilor totale după inversie, exprimate ca glucoză sau, acolo unde este cazul, ca zaharoză, prin conversie cu factorul 0,95. Ea este aplicabilă furajelor combinate. Pentru alte tipuri de furaje există metode specifice. Dacă este necesar, lactoza se determină separat, ținându-se cont de aceasta la calcularea rezultatelor. Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de zahăr utilizat la calcularea valorii energetice a furajului. În cazul în care conținutul de zahăr trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză. 2. Principiu Zaharurile se extrag în etanol diluat; soluția se limpezește cu soluții Carrez I și II. După eliminarea etanolului, cantitățile pre- și post-inversie se determină prin metoda Luff-Schoorl. 3. Reactivi 3.1. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C, neutralizată cu fenolftaleină. 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Metiloranj, soluție 0,1 % (greutate/volum). 3.5. Acid clorhidric 4 mol/litru. 3.6. Acid clorhidric 0,1 mol/litru. 3.7. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru. 3.8. Reactiv Luff-Schoorl:	

Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru), a se vedea (punctul 5.4) ultimul paragraf. pH-ul soluției este aproximativ 9,4. 3.8.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, Cu SO₄ 5H₂O, lipsită de fier, în 100 ml apă. 3.8.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, C₆H₈O₇•H₂O, în 50 ml de apă. 3.8.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească. 3.9. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. 3.10. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare. 3.11. Acid sulfuric 3 mol/litru. 3.12. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum). 3.13. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate. 3.14. 3-metilbutan-1-ol. 4. Aparatură Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm. 5. Procedura 5.1. Extracția eșantionului Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 200 ml etanol (punctul 3.1) și se amestecă timp de o oră în agitator. Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se amestecă timp de aproximativ 30 de secunde. Se adaugă aproximativ 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din nou timp de un minut. Se completează până la volum cu etanolul (punctul 3.1), se omogenizează și se filtrează. Se îndepărtează 200 ml de filtrat și se evaporă până la aproximativ jumătate din volum în	Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.8.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.8.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.8.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează. Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru), a se vedea (punctul 5.4) ultimul paragraf. pH-ul soluției este aproximativ 9,4. 3.8.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, Cu SO₄ 5H₂O, lipsită de fier, în 100 ml apă. 3.8.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, C₆H₈O₇•H₂O, în 50 ml de apă. 3.8.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească. 3.9. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. 3.10. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare. 3.11. Acid sulfuric 3 mol/litru. 3.12. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum). 3.13. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate. 3.14. 3-metilbutan-1-ol. 4. Aparatură Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm. 5. Procedura 5.1. Extracția eșantionului Se cântăresc 2,5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 200 ml etanol (punctul 3.1) și se amestecă timp de o oră în agitator. Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se	

scopul eliminării majorității etanolului. Reziduul rămas după evaporare se transferă cantitativ într-un balon gradat de 200 ml cu ajutorul apei calde, se răcește, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și, dacă este necesar, se filtrează. Această soluție se va utiliza pentru determinarea cantității zaharurilor reductoare și, după inversie, a zaharurilor totale. 5.2. Determinarea zaharurilor reductoare Cu ajutorul unei pipete se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă sub formă de conținut procentual de glucoză în eșantion. 5.3. Determinarea zaharurilor totale după inversie Cu ajutorul unei pipete se recoltează 50 ml de soluție și se transferă într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă câteva picături de soluție de metiloranj (punctul 3.4), apoi, amestecând continuu, se adaugă cu grijă acid clorhidric (punctul 3.5) până când lichidul virează într-un roșu bine definit. Se adaugă 15 ml de acid clorhidric (punctul 3.6), se scufundă balonul într-o baie de apă clocotindă și se menține acolo timp de 30 de minute. Se răcește rapid la aproximativ 20 °C și se adaugă 15 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.7). Se completează cu apă până la 100 ml și se omogenizează. Se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă în procente de glucoză sau, dacă este cazul, de zaharoză, prin multiplicare cu factorul 0,95. 5.4. Titrare prin metoda Luff-Schoorl Cu ajutorul unei pipete se recoltează 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) și se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml; se adaugă exact 25 ml din soluția de zaharuri	amestecă timp de aproximativ 30 de secunde. Se adaugă aproximativ 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din nou timp de un minut. Se completează până la volum cu etanolul (punctul 3.1), se omogenizează și se filtrează. Se îndepărtează 200 ml de filtrat și se evaporă până la aproximativ jumătate din volum în scopul eliminării majorității etanolului. Reziduul rămas după evaporare se transferă cantitativ într-un balon gradat de 200 ml cu ajutorul apei calde, se răcește, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și, dacă este necesar, se filtrează. Această soluție se va utiliza pentru determinarea cantității zaharurilor reductoare și, după inversie, a zaharurilor totale. 5.2. Determinarea zaharurilor reductoare Cu ajutorul unei pipete se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă sub formă de conținut procentual de glucoză în eșantion. 5.3. Determinarea zaharurilor totale după inversie Cu ajutorul unei pipete se recoltează 50 ml de soluție și se transferă într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă câteva picături de soluție de metiloranj (punctul 3.4), apoi, amestecând continuu, se adaugă cu grijă acid clorhidric (punctul 3.5) până când lichidul virează într-un roșu bine definit. Se adaugă 15 ml de acid clorhidric (punctul 3.6), se scufundă balonul într-o baie de apă clocotindă și se menține acolo timp de 30 de minute. Se răcește rapid la aproximativ 20 °C și se adaugă 15 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 3.7). Se completează cu apă până la 100 ml și se omogenizează. Se îndepărtează maximum 25 ml din soluția care conține mai puțin de 60 mg de zaharuri reductoare exprimate ca glucoză. Dacă este necesar, se completează	

limpezită. Se adaugă 2 granule de piatră ponce (punctul 3.13), se încălzește, amestecând manual, deasupra unei flăcări libere cu înălțime medie, aducându-se lichidul la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează: Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.9) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.10) și încheind titrarea. Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11), fără a se fierbe. 6. Calculul rezultatelor Utilizând tabelul, se stabilește cantitatea de glucoză în mg care corespunde diferenței dintre valorile celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Proceduri speciale 7.1. În cazul furajelor bogate în melase și al altor furaje care nu sunt în mod particular omogene, se cântăresc 20 g și se introduc, împreună cu 500 ml de apă, într-un balon gradat de 1 litru. Se amestecă timp de o oră în agitator. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul	până la 25 ml cu apă distilată și se determină conținutul în zaharuri reductoare prin metoda Luff-Schoorl. Rezultatul se exprimă în procente de glucoză sau, dacă este cazul, de zaharoză, prin multiplicare cu factorul 0,95. 5.4. Titrare prin metoda Luff-Schoorl Cu ajutorul unei pipete se recoltează 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) și se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml; se adaugă exact 25 ml din soluția de zaharuri limpezită. Se adaugă 2 granule de piatră ponce (punctul 3.13), se încălzește, amestecând manual, deasupra unei flăcări libere cu înălțime medie, aducându-se lichidul la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează: Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.9) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.10) și încheind titrarea. Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.8) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.12) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.11), fără a se fierbe. 6. Calculul rezultatelor Utilizând tabelul, se stabilește cantitatea de glucoză în mg care corespunde diferenței dintre valorile celor două titrări,	

3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1, utilizând, de data aceasta, o cantitate de patru ori mai mare din fiecare reactiv. Se completează până la volum cu etanol 80 % (v/v). Se omogenizează și se filtrează. Se elimină etanolul astfel cum se descrie la punctul 5.1. În absența amidonului dextrinizat, se completează până la volum cu apă distilată. 7.2. În cazul melaselor și al materiilor prime pentru furaje bogate în zaharuri și cvasi lipsite de amidon (roșcove, fulgi de rădăcină de sfeclă uscați etc.), se cântăresc 5 g, se introduc într-un balon gradat de 250 ml, se adaugă 200 ml apă distilată și se amestecă în agitator timp de o oră sau, dacă este necesar, mai mult. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul 3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1. Se completează până la volum cu apă rece, se omogenizează și se filtrează. Pentru determinarea cantității totale de zaharuri, se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.3. 8. Observații 8.1. În scopul prevenirii formării de spumă este recomandabil să se adauge (indiferent de volum) aproximativ 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (punctul 3.14) înainte de fierbere cu reactiv Luff-Schoorl. 8.2. Diferența dintre conținutul total de zaharuri după inversie exprimat ca glucoză și conținutul de zaharuri reductoare exprimat ca glucoză, multiplicată cu 0,95, reprezintă conținutul procentual de zaharoză. 8.3. Pentru a determina conținutul de zaharuri reductoare, cu excepția lactozei, se pot adopta două metode: 8.3.1. Pentru un calcul aproximativ, conținutul de lactoză stabilit printr-o metodă de analiză diferită se multiplică cu 0,675, iar rezultatul obținut se scade din conținutul de zaharuri reductoare. 8.3.2. Pentru un calcul precis al zaharurilor reductoare, cu excepția lactozei, se utilizează același eșantion în cele două	exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Proceduri speciale 7.1. În cazul furajelor bogate în melase și al altor furaje care nu sunt în mod particular omogene, se cântăresc 20 g și se introduc, împreună cu 500 ml de apă, într-un balon gradat de 1 litru. Se amestecă timp de o oră în agitator. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul 3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1, utilizând, de data aceasta, o cantitate de patru ori mai mare din fiecare reactiv. Se completează până la volum cu etanol 80 % (v/v). Se omogenizează și se filtrează. Se elimină etanolul astfel cum se descrie la punctul 5.1. În absența amidonului dextrinizat, se completează până la volum cu apă distilată. 7.2. În cazul melaselor și al materiilor prime pentru furaje bogate în zaharuri și cvasi lipsite de amidon (roșcove, fulgi de rădăcină de sfeclă uscați etc.), se cântăresc 5 g, se introduc într-un balon gradat de 250 ml, se adaugă 200 ml apă distilată și se amestecă în agitator timp de o oră sau, dacă este necesar, mai mult. Se limpezește cu ajutorul soluțiilor reactiv Carrez I (punctul 3.2) și II (punctul 3.3) astfel cum se descrie la punctul 5.1. Se completează până la volum cu apă rece, se omogenizează și se filtrează. Pentru determinarea cantității totale de zaharuri, se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.3. 8. Observații 8.1. În scopul prevenirii formării de spumă este recomandabil să se adauge (indiferent de volum) aproximativ 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (punctul 3.14) înainte de fierbere cu reactiv Luff-Schoorl. 8.2. Diferența dintre conținutul total de zaharuri după inversie exprimat ca glucoză și conținutul de zaharuri reductoare exprimat ca glucoză, multiplicată cu 0,95, reprezintă conținutul procentual de zaharoză.	

determinări finale. Una dintre analize se efectuează pe o parte din soluția obținută în conformitate cu punctul 5.1, alta pe o parte din soluția obținută în cursul determinării lactozei prin metoda stabilită în acest sens (după fermentarea celorlalte tipuri de zaharuri și limpezire).

În ambele cazuri, cantitatea de zaharuri prezentă se determină prin metoda Luff-Schoorl și se calculează în mg de glucoză. Una dintre valori se scade din cealaltă, iar diferența se exprimă ca procent din eșantion.

Exemplu

Cele două volume considerate corespund, pentru fiecare determinare, unui eșantion de 250 mg.

În primul caz, se consumă 17 ml de soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru, ceea ce corespunde la 44,2 mg de glucoză; în al doilea, 11 ml, ceea ce corespunde la 27,6 mg de glucoză.

Diferența este 16,6 mg de glucoză.

Prin urmare, conținutul de zaharuri reductoare (cu excepția lactozei), calculat ca glucoză, este:

$$\frac{416,6}{10} = 6,64\%$$

**Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl
ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, 2 minute încălzire, 10 minute fierbere**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	
ml	mg	diferență	mg	diferență

8.3. Pentru a determina conținutul de zaharuri reductoare, cu excepția lactozei, se pot adopta două metode:

8.3.1. Pentru un calcul aproximativ, conținutul de lactoză stabilit printr-o metodă de analiză diferită se multiplică cu 0,675, iar rezultatul obținut se scade din conținutul de zaharuri reductoare.

8.3.2. Pentru un calcul precis al zaharurilor reductoare, cu excepția lactozei, se utilizează același eșantion în cele două determinări finale. Una dintre analize se efectuează pe o parte din soluția obținută în conformitate cu punctul 5.1, alta pe o parte din soluția obținută în cursul determinării lactozei prin metoda stabilită în acest sens (după fermentarea celorlalte tipuri de zaharuri și limpezire).

În ambele cazuri, cantitatea de zaharuri prezentă se determină prin metoda Luff-Schoorl și se calculează în mg de glucoză. Una dintre valori se scade din cealaltă, iar diferența se exprimă ca procent din eșantion.

Exemplu

Cele două volume considerate corespund, pentru fiecare determinare, unui eșantion de 250 mg.

În primul caz, se consumă 17 ml de soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru, ceea ce corespunde la 44,2 mg de glucoză; în al doilea, 11 ml, ceea ce corespunde la 27,6 mg de glucoză.

Diferența este 16,6 mg de glucoză.

Prin urmare, conținutul de zaharuri reductoare (cu excepția lactozei), calculat ca glucoză, este:

$$\frac{416,6}{10} = 6,64\%$$

Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl

1	2,4	2,4	3,6	3,7	ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, 2 minute încălzire, 10 minute fierbere <table><tr><td>Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru</td><td colspan="2">Glucoză, fructoză zaharuri invertite C₆ H₁₂ O₆</td><td colspan="2">Lactoză C₁₂ H₂₂ O₁₁</td><td>Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru</td></tr><tr><td>ml</td><td>mg</td><td>diferență</td><td>mg</td><td>diferență</td><td>ml</td></tr></table>	Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	ml	mg	diferență	mg	diferență	ml		
Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁			Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru													
ml	mg	diferență	mg	diferență		ml													
2	4,8	2,4	7,3	3,7															
3	7,2	2,5	11,0	3,7															
4	9,7	2,5	14,7	3,7															
5	12,2	2,5	18,7	3,7															
6	14,7	2,5	22,4	3,7															
7	17,2	2,6	25,1	3,7															
8	19,8	2,6	28,8	3,7															
9	22,4	2,6	32,5	3,8															
10	25,0	2,6	36,2	3,8															
11	27,6	2,7	40,0	3,8															
12	30,3	2,7	43,8	3,8															
13	33,0	2,7	47,5	3,8															
14	35,7	2,8	51,2	3,8															
15	38,5	2,8	55,0	3,9															
16	41,3	2,9	58,8	3,9															
17	44,2	2,9	62,6	3,9															
18	47,1	2,9	66,4	4,0															
19	50,0	3,0	70,2	4,0															
20	53,0	3,0	74,0	4,1															
21	56,0	3,1	77,8	4,1															
22	59,1	3,1	81,6	4,1															
23	62,2		85,4																

		56,0		1	2,4	2,4	3,6	3,7	1		
		59,9		2	4,8	2,4	7,3	3,7	2		
		63,8		3	7,2	2,5	11,0	3,7	3		
		67,7		4	9,7	2,5	14,7	3,7	4		
		71,7		5	12,2	2,5	18,4	3,7	5		
		75,7		6	14,7	2,5	22,1	3,7	6		
		79,8		7	17,2	2,6	25,8	3,7	7		
		83,9		8	19,8	2,6	29,5	3,7	8		
		88,0		9	22,4	2,6	33,2	3,8	9		
				10	25,0	2,6	37,0	3,8	10		
				11	27,6	2,7	40,8	3,8	11		
				12	30,3	2,7	44,6	3,8	12		
				13	33,0	2,7	48,4	3,8	13		
				14	35,7	2,8	52,2	3,8	14		
				15	38,5	2,8		3,9	15		
				16	41,3	2,9			16		
				17	44,2	2,9			17		
				18	47,1	2,9			18		
				19	50,0	3,0			19		
				20	53,0	3,0			20		
				21	56,0	3,1			21		
				22	59,1	3,1			22		
				23	62,2				23		
J. DETERMINAREA LACTOZEI											
1. Obiectiv și domeniu de aplicare											
Această metodă permite determinarea conținutului de lactoză în furajele care au un conținut de lactoză mai mare de 0,5 %.											
2. Principiu											
Zaharurile se dizolvă în apă. Soluția este supusă fermentației de către drojdia <i>Saccharomyces cerevisiae</i> care nu descompune lactoza. După limpezire și filtrare, conținutul de lactoză al filtratului se determină prin metoda Luff-Schoorl.											
3. Reactivi											

3.1. Suspensie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: se suspendă 25 g de drojdie proaspătă în 100 ml de apă. Suspensia se păstrează în frigider o perioadă de maximum o săptămână. 3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, K₄ Fe (CN)₆ 3H₂O în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Reactiv Luff-Schoorl: Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.4.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.4.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.4.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează. Se verifică concentrația reactivului obținut astfel (Cu 0,05 mol/litru; Na₂ CO₃ 1 mol/litru). pH-ul soluției este aproximativ 9,4. 3.4.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, Cu SO₄ 5H₂O, lipsită de fier, în 100 ml apă. 3.4.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, C₆H₈O₇•H₂O, în 50 ml de apă. 3.4.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească. 3.5. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate. 3.6. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum). 3.7. Acid sulfuric 3 mol/litru. 3.8. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. 3.9. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare.		56,0	59,9	63,8	67,7	71,7	75,7	79,8	83,9	88,0	
J. DETERMINAREA LACTOZEI 1. <i>Obiectiv și domeniu de aplicare</i>											

4. *Aparatură*

Baie de apă cu termostat reglat la 38-40 °C.

5. *Procedura*

Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduce într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25-30 ml de apă. Balonul se introduce într-o baie de apă aflată la temperatura de fierbere, timp de 30 de minute, apoi se răcește la aproximativ 35 °C. Se adaugă 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1) și se omogenizează. Balonul se lasă să stea timp de două ore într-o baie de apă la temperatura de 38-40 °C. Se răcește la aproximativ 20 °C.

Se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din nou timp de 30 de secunde. Se completează cu apă până la 100 ml, se amestecă și se filtrează. Cu ajutorul unei pipete, se îndepărtează o cantitate de filtrat care nu depășește 25 ml și care conține, de preferință, 40-80 mg de lactoză, apoi se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml. Dacă este necesar, se completează cu apă până la 25 ml.

Se efectuează un test martor în același mod cu 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1). Se determină conținutul de lactoză prin metoda Luff-Schoorl, după cum urmează: se adaugă exact 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) și două granule de piatră ponce (punctul 3.5). Se amestecă manual concomitent cu încălzirea deasupra unei flăcări libere de înălțime medie, iar lichidul se aduce la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacără aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează:

Această metodă permite determinarea conținutului de lactoză în furajele care au un conținut de lactoză mai mare de 0,5 %.

2. *Principiu*

Zaharurile se dizolvă în apă. Soluția este supusă fermentației de către drojdia *Saccharomyces cerevisiae* care nu descompune lactoza. După limpezire și filtrare, conținutul de lactoză al filtratului se determină prin metoda Luff-Schoorl.

3. *Reactivi*

3.1. Suspensie de *Saccharomyces cerevisiae*: se suspendă 25 g de drojdie proaspătă în 100 ml de apă. Suspensia se păstrează în frigider o perioadă de maximum o săptămână.

3.2. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.3. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Reactiv Luff-Schoorl:

Amestecând cu grijă, se toarnă soluția de acid citric (punctul 3.4.2) în soluția de carbonat de sodiu (punctul 3.4.3). Se adaugă soluția de sulfat de cupru (punctul 3.4.1) și se completează până la 1 litru cu apă. Se lasă la decantare peste noapte și se filtrează. Se verifică concentrația reactivului obținut astfel ($Cu\ 0,05\ mol/litru$; $Na_2CO_3\ 1\ mol/litru$). pH-ul soluției este aproximativ 9,4.

3.4.1. Soluție de sulfat de cupru: se dizolvă 25 g de sulfat de cupru, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, lipsită de fier, în 100 ml apă.

3.4.2. Soluție de acid citric: se dizolvă 50 g de acid citric, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, în 50 ml de apă.

3.4.3. Soluție de carbonat de sodiu: se dizolvă 143,8 g de carbonat de sodiu anhidru în aproximativ 300 ml de apă caldă. Se lasă să se răcească.

3.5. Granule de piatră ponce fierte în acid clorhidric, spălate în apă și uscate.

Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml acid sulfuric (punctul 3.7). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.8) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.9) și încheind titrarea. Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.7), fără a se fierbe. 6. Calculul rezultatelor Utilizând tabelul atașat, se stabilește cantitatea de lactoză în mg care corespunde diferenței dintre rezultatele celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatul pentru lactoza anhidră se exprimă ca procent din eșantion. 7. Observație 1. Pentru produsele care conțin mai mult de 40 % zahăr fermentescibil, se utilizează mai mult de 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1). 2. În hrana „cu conținut redus de lactoză” (de exemplu, laptele pentru pisici), lactoza este convertită în fructoză, care nu este complet fermentată în decurs de două ore, ceea ce duce la rezultate pozitive mai mari sau false (deoarece reziduurile de fructoză rămân în extract). Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, două minute încălzire, 10 minute fierbere	3.6. Iodură de potasiu, soluție 30 % (greutate/volum). 3.7. Acid sulfuric 3 mol/litru. 3.8. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. 3.9. Soluție de amidon: se adaugă un amestec de 5 g de amidon solubil cu 30 ml de apă la 1 litru de apă în stare de fierbere. Se fierbe timp de 3 minute, se lasă să se răcească și, dacă este necesar, se adaugă 10 mg de iodură de mercur ca agent de conservare. 4. Aparatură Baie de apă cu termostat reglat la 38-40 °C. 5. Procedura Se cântărește 1 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduce într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25-30 ml de apă. Balonul se introduce într-o baie de apă aflată la temperatura de fierbere, timp de 30 de minute, apoi se răcește la aproximativ 35 °C. Se adaugă 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1) și se omogenizează. Balonul se lasă să stea timp de două ore într-o baie de apă la temperatura de 38-40 °C. Se răcește la aproximativ 20 °C. Se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.2) și se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 2,5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.3) și se amestecă din nou timp de 30 de secunde. Se completează cu apă până la 100 ml, se amestecă și se filtrează. Cu ajutorul unei pipete, se îndepărtează o cantitate de filtrat care nu depășește 25 ml și care conține, de preferință, 40-80 mg de lactoză, apoi se transferă într-un flacon Erlenmeyer de 300 ml. Dacă este necesar, se completează cu apă până la 25 ml. Se efectuează un test martor în același mod cu 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1). Se determină conținutul de lactoză prin metoda Luff-Schoorl, după cum urmează: se adaugă exact 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) și două granule de piatră ponce (punctul 3.5). Se amestecă manual concomitent cu încălzirea deasupra unei flăcări libere				
<table> <tr> <td data-bbox="21 1323 195 1433">Na₂ S₂ O₃</td> <td data-bbox="195 1323 667 1433">Glucoză, fructoză zaharuri invertite</td> <td data-bbox="667 1323 844 1433">Lactoză</td> </tr> </table>	Na ₂ S ₂ O ₃	Glucoză, fructoză zaharuri invertite	Lactoză		
Na ₂ S ₂ O ₃	Glucoză, fructoză zaharuri invertite	Lactoză			

0,1 mol/litru		C ₆ H ₁₂ O ₆		C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		de înălțime 0,1 mol/litru
ml	mg	diferență	mg	diferență	ml	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1	de înălțime medie, iar lichidul se aduce la fierbere în aproximativ 2 minute. Flaconul Erlenmeyer se așază imediat pe o plasă de sârmă acoperită cu azbest având un orificiu cu diametru de aproximativ 6 cm sub care există o flacăra aprinsă. Flacăra se reglează astfel încât să se încălzească doar baza flaconului Erlenmeyer. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux. Se fierbe exact 10 minute. Se răcește imediat în apă rece și, după aproximativ 5 minute, se titrează după cum urmează: Se adaugă 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și, imediat după aceea (cu grijă, din cauza riscului formării unei spume abundente), se adaugă 25 ml acid sulfuric (punctul 3.7). Se titrează în continuare cu soluție de tiosulfat de sodiu (punctul 3.8) până la apariția unei coloraturi galben șters, adăugând ca indicator soluția de amidon (punctul 3.9) și încheind titrarea. Se efectuează aceeași titrare pe un amestec de 25 ml de reactiv Luff-Schoorl (punctul 3.4) cu 25 ml de apă, măsurat cu precizie, după ce s-au adăugat 10 ml de soluție de iodură de potasiu (punctul 3.6) și 25 ml de acid sulfuric (punctul 3.7), fără a se fierbe. 6.2 Calculul rezultatelor Utilizând tabelul atașat, se stabilește cantitatea de lactoză în mg care corespunde diferenței dintre rezultatele celor două titrări, exprimate în ml de tiosulfat de sodiu 0,1 mol/litru. Rezultatul pentru lactoza anhidră se exprimă ca procent din esanțion. 7. Observație 1. Pentru produsele care conțin mai mult de 40 % zahăr fermentescibil, se utilizează mai mult de 5 ml de suspensie de drojdie (punctul 3.1). 2. În hrana „cu conținut redus de lactoză” (de exemplu, laptele pentru pisici), lactoza este convertită în fructoză, care nu este complet fermentată în decurs de două ore, ceea ce
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2	
3	7,2	2,5	11,	3,7	3	
4	9,7	2,5	0	3,7	4	
5	12,2	2,5	14,	3,7	5	
6	14,7	2,5	7	3,7	6	
7	17,2	2,6	18,	3,7	7	
8	19,8	2,6	4	3,7	8	
9	22,4	2,6	22,	3,8	9	
10	25,0	2,6	1	3,8	10	
11	27,6	2,7	25,	3,8	11	
12	30,3	2,7	8	3,8	12	
13	33,0	2,7	29,	3,8	13	
14	35,7	2,8	5	3,8	14	
15	38,5	2,8	33,	3,9	15	
16	41,3	2,9	2	3,9	16	
17	44,2	2,9	37,	3,9	17	
18	47,1	2,9	0	3,9	18	
19	50,0	3,0	40,	4,0	19	
20	53,0	3,0	8	4,0	20	
			44,	4,1		
			6			

21	56,0	3,1	48,4	4,1	duce la rezultate pozitive mai mari sau false (deoarece reziduurile de fructoză rămân în extract). Tabel de valori pentru 25 ml de reactiv Luff-Schoorl ml de Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru, două minute încălzire, 10 minute fierbere <table><tr><th>Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/litru</th><th colspan="2">Glucoză, fructoză zaharuri invertite C₆ H₁₂ O₆</th><th colspan="2">Lactoză C₁₂ H₂₂ O₁₁</th></tr><tr><th>ml</th><th>mg</th><th>diferență</th><th>mg</th><th>diferență</th></tr><tr><td>1</td><td>2,4</td><td>2,4</td><td>3,6</td><td>3,7</td></tr><tr><td>2</td><td>4,8</td><td>2,4</td><td>7,3</td><td>3,7</td></tr><tr><td>3</td><td>7,2</td><td>2,5</td><td>11,0</td><td>3,7</td></tr><tr><td>4</td><td>9,7</td><td>2,5</td><td>14,7</td><td>3,7</td></tr><tr><td>5</td><td>12,2</td><td>2,5</td><td>18,4</td><td>3,7</td></tr><tr><td>6</td><td>14,7</td><td>2,5</td><td>22,1</td><td>3,7</td></tr><tr><td>7</td><td>17,2</td><td>2,6</td><td>25,8</td><td>3,7</td></tr><tr><td>8</td><td>19,8</td><td>2,6</td><td>29,5</td><td>3,7</td></tr><tr><td>9</td><td>22,4</td><td>2,6</td><td>33,2</td><td>3,8</td></tr><tr><td>10</td><td>25,0</td><td>2,6</td><td>36,9</td><td>3,8</td></tr><tr><td>11</td><td>27,6</td><td>2,7</td><td>40,6</td><td>3,8</td></tr><tr><td>12</td><td>30,3</td><td>2,7</td><td>44,3</td><td>3,8</td></tr><tr><td>13</td><td>33,0</td><td>2,7</td><td>48,0</td><td>3,8</td></tr><tr><td>14</td><td>35,7</td><td>2,8</td><td>51,7</td><td>3,8</td></tr><tr><td>15</td><td>38,5</td><td>2,8</td><td>55,4</td><td>3,9</td></tr></table>	Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		ml	mg	diferență	mg	diferență	1	2,4	2,4	3,6	3,7	2	4,8	2,4	7,3	3,7	3	7,2	2,5	11,0	3,7	4	9,7	2,5	14,7	3,7	5	12,2	2,5	18,4	3,7	6	14,7	2,5	22,1	3,7	7	17,2	2,6	25,8	3,7	8	19,8	2,6	29,5	3,7	9	22,4	2,6	33,2	3,8	10	25,0	2,6	36,9	3,8	11	27,6	2,7	40,6	3,8	12	30,3	2,7	44,3	3,8	13	33,0	2,7	48,0	3,8	14	35,7	2,8	51,7	3,8	15	38,5	2,8	55,4	3,9
Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/litru	Glucoză, fructoză zaharuri invertite C ₆ H ₁₂ O ₆		Lactoză C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁																																																																																							
ml	mg	diferență	mg	diferență																																																																																						
1	2,4	2,4	3,6	3,7																																																																																						
2	4,8	2,4	7,3	3,7																																																																																						
3	7,2	2,5	11,0	3,7																																																																																						
4	9,7	2,5	14,7	3,7																																																																																						
5	12,2	2,5	18,4	3,7																																																																																						
6	14,7	2,5	22,1	3,7																																																																																						
7	17,2	2,6	25,8	3,7																																																																																						
8	19,8	2,6	29,5	3,7																																																																																						
9	22,4	2,6	33,2	3,8																																																																																						
10	25,0	2,6	36,9	3,8																																																																																						
11	27,6	2,7	40,6	3,8																																																																																						
12	30,3	2,7	44,3	3,8																																																																																						
13	33,0	2,7	48,0	3,8																																																																																						
14	35,7	2,8	51,7	3,8																																																																																						
15	38,5	2,8	55,4	3,9																																																																																						
22	59,1	3,1	52,2	4,1																																																																																						
23	62,2		56,0																																																																																							
K. DETERMINAREA AMIDONULUI METODA POLARIMETRICĂ 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de amidon și a produselor de degradare a amidonului cu masă																																																																																										

moleculară mare cu scopul de a se verifica conformitatea cu valoarea energetică declarată (prevederile din anexa VII) și cu Regulamentul (CE) nr. 767/2009. Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de amidon utilizat la calcularea valorii energetice a furajului. În cazul în care conținutul de amidon trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză. 2. Principiu Metoda cuprinde două determinări. În prima, eșantionul este tratat cu acid clorhidric diluat. După limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică a soluției prin polarimetrie. În cea de-a doua, eșantionul este extras cu etanol 40 %. După acidificarea filtratului cu acid clorhidric, limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică la fel ca în prima determinare. Diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut, oferă conținutul de amidon al eșantionului. 3. Reactivi 3.1. Acid clorhidric, soluție cu concentrație 25 % (g/g): 1,126 g/ml. 3.2. Acid clorhidric, soluție 1,13 % (greutate/volum) Concentrația se verifică prin titrare folosind o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru în prezența roșului de metil 0,1 % (greutate/volum) în etanol 94 % (v/v). Pentru neutralizarea a 10 ml sunt necesari 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/litru. 3.3. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.4. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, K₄ Fe (CN)₆ 3H₂O în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.5. Etanol, soluție cu concentrație de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C. 4. Aparatură	16	41,3	2,9	37,	3,9	16	
	17	44,2	2,9	0	3,9	17	
	18	47,1	2,9	40,	4,0	18	
	19	50,0	3,0	8	4,0	19	
	20	53,0	3,0	44,	4,1	20	
	21	56,0	3,1	6	4,1	21	
	22	59,1	3,1	48,	4,1	22	
	23	62,2		4		23	
				52,			
				2			
				56,			
				0			
				59,			
				9			
				63,			
				8			
				67,			
				7			
				71,			
				7			
				75,			
				7			
				79,			
				8			
				83,			
				9			

4.1. Flacon Erlenmeyer de 250 ml cu îmbinare de sticlă șlefuită standard și cu condensator cu reflux.				88,			
4.2. Polarimetru sau zaharimetru.				0			
5. Procedura							
5.1. Pregătirea eșantionului							
Eșantionul se zdrobește până când devine suficient de fin pentru a trece complet printr-o sită cu orificii rotunde de 0,5 mm.							
5.2. Determinarea rotației optice totale (P sau S) (a se vedea observația de la punctul 7.1)							
Se cântăresc 2,5 g din eșantionul zdrobit cu abatere de 1 mg și se introduc într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2), se agită pentru a obține o distribuție uniformă a eșantionului de testat și se adaugă încă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se scufundă balonul într-o baie de apă care fierbe, agitându-se cu putere și în mod constant în primele trei minute pentru a preveni formarea de aglomerări. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere atunci când balonul este introdus în ea. Balonul nu trebuie să fie scos din baie în timp ce este agitat. După exact 15 minute, se scoate din baie, se adaugă 30 ml de apă rece și se răcește imediat la 20 °C.							
Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.3) și se agită timp de aproximativ 30 de secunde. Apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.4) și se agită din nou timp de aproximativ 30 de secunde. Se completează cu apă până la volum, se amestecă și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect limpede (ceea ce se întâmplă rar), se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare din soluțiile Carrez I și II, de exemplu 10 ml. Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetrul sau cu zaharimetrul.							
5.3. Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în etanol 40 %							
	K. DETERMINAREA AMIDONULUI						
	METODA POLARIMETRICĂ						
	1. Obiectiv și domeniu de aplicare						
	Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de amidon și a produselor de degradare a amidonului cu masă moleculară mare cu scopul de a se verifica conformitatea cu valoarea energetică declarată (prevederile din anexa nr. 7) și cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.						
	Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de amidon utilizat la calcularea valorii energetice a furajului.						
	În cazul în care conținutul de amidon trebuie determinat în alte scopuri, se pot utiliza alte metode de analiză.						
	2. Principiu						
	Metoda cuprinde două determinări. În prima, eșantionul este tratat cu acid clorhidric diluat. După limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică a soluției prin polarimetrie.						
	În cea de-a doua, eșantionul este extras cu etanol 40 %. După acidificarea filtratului cu acid clorhidric, limpezire și filtrare, se măsoară rotația optică la fel ca în prima determinare.						
	Diferența dintre cele două măsurători, multiplicată cu un factor cunoscut, oferă conținutul de amidon al eșantionului.						
	3. Reactivi						
	3.1. Acid clorhidric, soluție cu concentrație 25 % (g/g): 1,126 g/ml.						
	3.2. Acid clorhidric, soluție 1,13 % (greutate/volum)						
	Concentrația se verifică prin titrare folosind o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 mol/litru în prezența roșului de metil 0,1 % (greutate/volum) în etanol 94 % (v/v). Pentru						

Se cântăresc 5 g din eşantion cu abatere de 1 mg, se introduc într-un balon gradat de 100 ml şi se adaugă aproximativ 80 ml de etanol (punctul 3.5) (a se vedea observaţia de la punctul 7.2). Se lasă balonul să stea timp de 1 oră la temperatura camerei; în acest timp, se agită cu putere de şase ori astfel încât eşantionul de testat să se amestece complet cu etanolul. Se completează până la volum cu etanol (punctul 3.5), se amestecă şi se filtrează.

Se pipetează 50 ml de filtrat (corespunde la 2,5 g de eşantion) într-un flacon Erlenmeyer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) şi se agită puternic. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux, iar vasul se scufundă într-o baie de apă în fierbere. După exact 15 minute, se scoate flaconul Erlenmeyer din baie, se transferă conţinutul într-un balon gradat de 100 ml, clătind cu puţină apă rece şi se răceşte la 20 °C.

Se limpezeşte folosind soluţiile Carrez I (punctul 3.3) şi II (punctul 3.4), se completează până la volum cu apă, se amestecă, se filtrează şi se măsoară rotaţia optică astfel cum se indică la punctul 5.2 paragrafele doi şi trei.

6. Calculul rezultatelor

Conţinutul de amidon (%) se calculează după cum urmează:

6.1. Măsurare cu polarimetrul

$$\text{Conţinut de amidon (\%)} = \frac{\alpha}{[\alpha]_D^{20}} \cdot 100$$

= rotaţia optică totală în grade unghiulare

P

P=rotaţia optică în grade unghiulare a substanţelor solubile în etanol 40 % (V/V)

$[\alpha]_D^{20}$ =rotaţia optică specifică a amidonului pur. Valorile numerice acceptate în mod convenţional pentru acest factor sunt următoarele:

+ 185,9° : amidon din orez

neutralizarea a 10 ml sunt necesari 30,94 ml de NaOH 0,1 mol/litru.

3.3. Soluţie Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn (CH₃ COO)₂ 2H₂O şi 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.4. Soluţie Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, K₄ Fe (CN)₆ 3H₂O în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.5. Etanol, soluţie cu concentraţie de 40 % (v/v): 0,948 g/ml la 20 °C.

4. Aparatură

4.1. Flacon Erlenmeyer de 250 ml cu îmbinare de sticlă şlefuită standard şi cu condensator cu reflux.

4.2. Polarimetru sau zaharimetru.

5. Procedura

5.1. Pregătirea eşantionului

Eşantionul se zdrobeşte până când devine suficient de fin pentru a trece complet printr-o sită cu orificii rotunde de 0,5 mm.

5.2. Determinarea rotaţiei optice totale (P sau S) (a se vedea observaţia de la punctul 7.1)

Se cântăresc 2,5 g din eşantionul zdrobit cu abatere de 1 mg şi se introduc într-un balon gradat de 100 ml. Se adaugă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2), se agită pentru a obţine o distribuţie uniformă a eşantionului de testat şi se adaugă încă 25 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se scufundă balonul într-o baie de apă care fierbe, agitându-se cu putere şi în mod constant în primele trei minute pentru a preveni formarea de aglomerări. Cantitatea de apă din baia de apă trebuie să fie suficientă pentru ca baia să rămână la punctul de fierbere atunci când balonul este introdus în ea. Balonul nu trebuie să fie scos din baie în timp ce este agitat. După exact 15 minute, se scoate din baie, se adaugă 30 ml de apă rece şi se răceşte imediat la 20 °C.

+ 185,7° : amidon din cartofi + 184,6° : amidon din porumb + 182,7° : amidon din grâu + 181,5° : amidon din orz + 181,3° : amidon din ovăz + 184, :alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon în furaje 0 combinate 6.2. Măsurare cu zaharimetrul $(\%) = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20}} \frac{(2N_0,665)(S-S')}{100}$ S = rotația optică în grade zaharimetrice a substanțelor solubile în etanol 40 % (v/v) N=greutatea (g) a zaharozei în 100 ml de apă determinând o rotație optică de 100 grade zaharimetrice măsurată cu un tub de 200 mm 16,29 g pentru zaharimetrele franceze 26,00 g pentru zaharimetrele germane 20,00 g pentru zaharimetrele mixte. $[\alpha]_D^{20}$=rotația optică specifică a amidonului pur (a se vedea punctul 6.1) 6.3. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,4 în valoare absolută pentru un conținut de amidon mai mic de 40 % și 1 % în valoare relativă în cazul conținutului de amidon egal sau mai mare de 40 %. 7. Observații 7.1. În cazul în care eșantionul conține mai mult de 6 % carbonați, calculați sub formă de carbonat de calciu, aceștia	Se adaugă 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.3) și se agită timp de aproximativ 30 de secunde. Apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.4) și se agită din nou timp de aproximativ 30 de secunde. Se completează cu apă până la volum, se amestecă și se filtrează. Dacă filtratul nu este perfect limpede (ceea ce se întâmplă rar), se repetă determinarea folosind o cantitate mai mare din soluțiile Carrez I și II, de exemplu 10 ml. Se măsoară rotația optică a soluției într-un tub de 200 mm cu polarimetrul sau cu zaharimetrul. 5.3. Determinarea rotației optice (P' sau S') a substanțelor solubile în etanol 40 % Se cântăresc 5 g din eșantion cu abatere de 1 mg, se introduc într-un balon gradat de 100 ml și se adaugă aproximativ 80 ml de etanol (punctul 3.5) (a se vedea observația de la punctul 7.2). Se lasă balonul să stea timp de 1 oră la temperatura camerei; în acest timp, se agită cu putere de șase ori astfel încât eșantionul de testat să se amestece complet cu etanolul. Se completează până la volum cu etanol (punctul 3.5), se amestecă și se filtrează. Se pipetează 50 ml de filtrat (corespunde la 2,5 g de eșantion) într-un flacon Erlenmeyer de 250 ml, se adaugă 2,1 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) și se agită puternic. La flaconul Erlenmeyer se montează un condensator cu reflux, iar vasul se scufundă într-o baie de apă în fierbere. După exact 15 minute, se scoate flaconul Erlenmeyer din baie, se transferă conținutul într-un balon gradat de 100 ml, clătind cu puțină apă rece și se răcește la 20 °C. Se limpezește folosind soluțiile Carrez I (punctul 3.3) și II (punctul 3.4), se completează până la volum cu apă, se amestecă, se filtrează și se măsoară rotația optică astfel cum se indică la punctul 5.2 paragrafele doi și trei. 6. Calculul rezultatelor Conținutul de amidon (%) se calculează după cum urmează:	

trebuie distruși prin tratare cu o cantitate perfect adecvată de acid sulfuric diluat înaintea determinării rotației optice totale.

7.2. În cazul produselor cu un conținut mare de lactoză, cum ar fi zerul praf sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează după adăugarea a 80 ml etanol (punctul 3.5). La balon se fixează un condensator cu reflux, iar balonul se scufundă într-o baie de apă la 50 °C timp de 30 de minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza astfel cum se indică la punctul 5.3.

7.3. În cazul în care sunt prezente în cantități semnificative în furaje, următoarele materii prime furajere sunt cunoscute ca dând naștere la interferențe atunci când conținutul de amidon se determină prin metoda polarimetrică și, din acest motiv, se pot obține rezultate incorecte:

- produse din sfeclă (de zahăr), precum pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), vinasă de sfeclă (de zahăr), zahăr (din sfeclă);
- pulpă de citrice;
- semințe de in; șrot de semințe de in; șrot de semințe de in rezultat după extracție;
- semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță rezultat după extracție; coji de semințe de rapiță;
- semințe de floarea soarelui; șrot de semințe de floarea soarelui rezultat după extracție; semințe de floarea soarelui parțial decorticate, rezultate după extracție;
- șrot de copra; șrot de copra rezultat după extracție;
- pulpă de cartofi;
- drojdie deshidratată;
- produse bogate în inulină (de exemplu, fulgi și făină de topinambur);
- jumări;

6.1. Măsurare cu polarimetrul

$$\text{Conținut de amidon (\%)} = \frac{\text{rotația optică totală în grade unghiulare}}{\text{rotația optică totală în grade unghiulare}}$$

P

P=rotația optică în grade unghiulare a substanțelor solubile în etanol 40 % (V/V)

[α]_D²⁰=rotația optică specifică a amidonului pur. Valorile numerice acceptate în mod convențional pentru acest factor sunt următoarele:

- + 185,9° : amidon din orez
- + 185,7° : amidon din cartofi
- + 184,6° : amidon din porumb
- + 182,7° : amidon din grâu
- + 181,5° : amidon din orz
- + 181,3° : amidon din ovăz
- + 184 :alte tipuri de amidon și amestecuri de amidon în furaje ,0 combinate

6.2. Măsurare cu zaharimetrul

$$(\%) = \frac{2000 (2 N 0,665)}{[\alpha]_D^{20}} \left(S - \xi \right)$$

=rotația optică totală în grade zaharimetrice

S

S=rotația optică în grade zaharimetrice a substanțelor solubile în etanol 40 % (v/v)

N=greutatea (g) a zaharozei în 100 ml de apă determinând o rotație optică de 100 grade zaharimetrice măsurată cu un tub de 200 mm

- 16,29 g pentru zaharimetrele franceze
- 26,00 g pentru zaharimetrele germane
- 20,00 g pentru zaharimetrele mixte.

— produse din soia În aceste cazuri, se poate aplica metoda de analiză prevăzută de Regulamentul (CE) nr. 121/2008 al Comisiei (18). Această metodă poate fi utilizată și pentru furajele care conțin mai puțin de 1 % amidon. L. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CENUȘĂ BRUTĂ 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de cenușă brută. 2. Principiu Eșantionul se calcinează la 550 °C; reziduul se cântărește. 3. Reactivi Nitrat de amoniu, soluție 20 % (greutate/volum). 4. Aparatură 4.1. Plită. 4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat. 4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm). 5. Procedura Se cântăresc aproximativ 5 g de eşantion cu o abatere de 1 mg (2,5 g pentru produsele cu tendință de umflare) și se introduc într-un creuzet pentru calcinare, care în prealabil a fost încălzit la 550 °C, răcit și tarat. Se aşază creuzetul pe plită și se încălzește progresiv până la carbonizarea materialului. Se calcinează în conformitate cu mențiunile de la punctul 5.1 sau 5.2. 5.1. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se menține la această temperatură până la obținerea unei cenuși albe, gri deschis sau roșiatice, aparent lipsită de particule carbonizate. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat.	$[\alpha]_D^{25}$ = rotația optică specifică a amidonului pur (a se vedea punctul 6.1) 6.3. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească 0,4 în valoare absolută pentru un conținut de amidon mai mic de 40 % și 1 % în valoare relativă în cazul conținutului de amidon egal sau mai mare de 40 %. 7. Observații 7.1. În cazul în care eşantionul conține mai mult de 6 % carbonați, calculați sub formă de carbonat de calciu, aceștia trebuie distruși prin tratare cu o cantitate perfect adecvată de acid sulfuric diluat înaintea determinării rotației optice totale. 7.2. În cazul produselor cu un conținut mare de lactoză, cum ar fi zerul praf sau laptele praf degresat, se procedează după cum urmează după adăugarea a 80 ml etanol (punctul 3.5). La balon se fixează un condensator cu reflux, iar balonul se scufundă într-o baie de apă la 50 °C timp de 30 de minute. Se lasă să se răcească și se continuă analiza astfel cum se indică la punctul 5.3. 7.3. În cazul în care sunt prezente în cantități semnificative în furaje, următoarele materii prime furajere sunt cunoscute ca dând naștere la interferențe atunci când conținutul de amidon se determină prin metoda polarimetrică și, din acest motiv, se pot obține rezultate incorecte: — produse din sfeclă (de zahăr), precum pulpă de sfeclă (de zahăr), melasă de sfeclă (de zahăr), pulpă melasată de sfeclă (de zahăr), vinasă de sfeclă (de zahăr), zahăr (din sfeclă); — pulpă de citrice; — semințe de in; șrot de semințe de in; șrot de semințe de in rezultat după extracție;	

5.2. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se calcinează timp de 3 ore. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat. Se calcinează din nou timp de 30 de minute pentru a asigura că greutatea cenușii rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg). 6. Calculul rezultatelor Se calculează greutatea reziduului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Observații 7.1. Cenușa <i>substanțelor dificil de calcinat</i> trebuie supusă unei calcinări inițiale timp de cel puțin trei ore, urmată de răcire și de adăugarea câtorva picături de soluție de nitrat de amoniu 20 % sau de apă (cu grijă, pentru a evita dispersarea cenușii și formarea de aglomerări). Se continuă calcinarea după uscarea în cuptor. Operația se repetă până când calcinarea este completă. 7.2. În cazul <i>substanțelor rezistente la tratamentul</i> descris la punctul 7.1, se procedează în felul următor: după calcinare timp de trei ore, se introduce cenușa în apă caldă și se filtrează printr-un filtru mic, lipsit de cenușă. Filtrul și conținutul său se calcinează în creuzetul inițial. Filtratul se introduce în creuzetul răcit, se evaporă până la uscare, se calcinează și se cântărește. 7.3. În cazul <i>uleiurilor și grăsimilor</i>, se cântăresc cu precizie 25 g de eșantion într-un creuzet de dimensiuni adecvate. Se carbonizează prin aprinderea materialului cu ajutorul unei benzi de filtru de hârtie, lipsit de cenușă. După combustie, se umectează cu cât mai puțină apă. Se usucă și se calcinează astfel cum se descrie la punctul 5. M. DETERMINAREA CENUȘII INSOLUBILE ÎN ACID CLORHIDRIC 1. Obiectiv și domeniu de aplicare	— semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță; șrot de semințe de rapiță rezultat după extracție; coji de semințe de rapiță; — semințe de floarea soarelui; șrot de semințe de floarea soarelui rezultat după extracție; semințe de floarea soarelui parțial decorticate, rezultate după extracție; — șrot de copra; șrot de copra rezultat după extracție; — pulpă de cartofi; — drojdie deshidratată; — produse bogate în inulină (de exemplu, fulgi și făină de topinambur); — jumări; — produse din soia În aceste cazuri, se poate aplica metoda de analiză prevăzută și utilizată și pentru furajele care conțin mai puțin de 1 % amidon. L. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CENUȘĂ BRUTĂ 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de cenușă brută. 2. Principiu Eșantionul se calcinează la 550 °C; reziduul se cântărește. 3. Reactivi Nitrat de amoniu, soluție 20 % (greutate/volum). 4. Aparatură 4.1. Plită. 4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat. 4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm). 5. Procedura	

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de substanțe minerale insolubile în acid clorhidric. Se pot utiliza două metode, în funcție de natura eșantionului. 1.1. <i>Metoda A</i>: aplicabilă materiilor prime furajere organice furaje și majorității furajelor combinate; 1.2. <i>Metoda B</i>: aplicabilă compușilor și amestecurilor minerale, precum furajelor combinate al căror conținut de substanțe insolubile în acid clorhidric, determinat conform metodei A, este mai mare de 1 %. 2. Principiu 2.1. <i>Metoda A</i>: eșantionul se calcinează, cenușa se fierbe în acid clorhidric, iar reziduul insolubil se filtrează și se cântărește. 2.2. <i>Metoda B</i>: eșantionul se tratează cu acid clorhidric. Soluția se filtrează, reziduul se calcinează, iar cenușa astfel obținută se tratează conform metodei A. 3. Reactivi 3.1. Acid clorhidric 3 mol/litru. 3.2. Acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum). 3.3. Acid tricloracetic, soluție 1 % (greutate/volum). 4. Aparatură 4.1. Plită. 4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat. 4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ 60 × 40 × 25 mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm). 4.4. Filtre lipsite de cenușă 5. Procedura 5.1. Metoda A: Eșantionul se calcinează prin metoda descrisă la determinarea cenușii brute. Se poate utiliza și cenușă obținută din analiza respectivă. Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se aduce lent	Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg (2,5 g pentru produsele cu tendință de umflare) și se introduc într-un creuzet pentru calcinare, care în prealabil a fost încălzit la 550 °C, răcit și tarat. Se așază creuzetul pe plită și se încălzește progresiv până la carbonizarea materialului. Se calcinează în conformitate cu mențiunile de la punctul 5.1 sau 5.2. 5.1. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se menține la această temperatură până la obținerea unei cenuși albe, gri deschis sau roșiatice, aparent lipsită de particule carbonizate. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat. 5.2. Se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă calibrat, reglat la 550 °C. Se calcinează timp de 3 ore. Se introduce creuzetul într-un desicator, se lasă să se răcească și se cântărește imediat. Se calcinează din nou timp de 30 de minute pentru a asigura că greutatea cenușii rămâne constantă (pierderea de greutate între două cântăriri succesive trebuie să fie mai mică sau egală cu 1 mg). 6. Calculul rezultatelor Se calculează greutatea reziduului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Observații 7.1. Cenușa <i>substanțelor dificil de calcinat</i> trebuie supusă unei calcinări inițiale timp de cel puțin trei ore, urmată de răcire și de adăugarea câtorva picături de soluție de nitrat de amoniu 20 % sau de apă (cu grijă, pentru a evita dispersarea cenușii și formarea de aglomerări). Se continuă calcinarea după uscarea în cuptor. Operația se repetă până când calcinarea este completă. 7.2. În cazul <i>substanțelor rezistente la tratamentul</i> descris la punctul 7.1, se procedează în felul următor: după calcinare timp de trei ore, se introduce cenușa în apă caldă și se filtrează printr-un filtru mic, lipsit de cenușă. Filtrul și	

la fierbere și se fierbe încet timp de 15 minute. Soluția caldă se filtrează printr-un filtru de hârtie lipsit de cenușă, iar reziduul se spală cu apă caldă până când reacția acidă nu mai este vizibilă. Filtrul care conține reziduul se usucă și se calcinează într-un creuzet tarat, la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește. 5.2. Metoda B Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un pahar de laborator de 250-400 ml. Se adaugă succesiv 25 ml apă și 25 ml acid clorhidric (punctul 3.1), se amestecă și se așteaptă ca efervescența să înceteze. Se adaugă încă 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se așteaptă ca degajarea de gaz să înceteze, apoi se introduce paharul de laborator într-o baie de apă la temperatura de fierbere și se menține acolo timp de 30 de minute sau, dacă este necesar, mai mult, pentru ca amidonul eventual prezent să se hidrolizeze complet. Se filtrează până este încă cald, printr-un filtru lipsit de cenușă, iar filtrul se spală în 50 ml de apă caldă (a se vedea observația 7). Se introduce filtrul care conține reziduul într-un creuzet pentru calcinare, se usucă și se calcinează la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1); se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.1, al doilea paragraf. 6. Calculul rezultatelor Se calculează greutatea reziduului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Observație Dacă filtrarea se dovedește dificilă, se reia analiza, înlocuind cei 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) cu 50 ml de acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum) (punctul 3.2) și spălând filtrul într-o soluție caldă de acid tricloracetic 1 % (punctul 3.3).	conținutul său se calcinează în creuzetul inițial. Filtratul se introduce în creuzetul răcit, se evaporă până la uscare, se calcinează și se cântărește. 7.3. În cazul <i>uleiurilor și grăsimilor</i>, se cântăresc cu precizie 25 g de eșantion într-un creuzet de dimensiuni adecvate. Se carbonizează prin aprinderea materialului cu ajutorul unei benzi de filtru de hârtie, lipsit de cenușă. După combustie, se umectează cu cât mai puțină apă. Se usucă și se calcinează astfel cum se descrie la punctul 5. M. DETERMINAREA CENUȘII INSOLUBILE ÎN ACID CLORHIDRIC 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de substanțe minerale insolubile în acid clorhidric. Se pot utiliza două metode, în funcție de natura eșantionului. 1.1. <i>Metoda A:</i> aplicabilă materiilor prime furajere organice furaje și majorității furajelor combinate; 1.2. <i>Metoda B:</i> aplicabilă compușilor și amestecurilor minerale, precum furajelor combinate al căror conținut de substanțe insolubile în acid clorhidric, determinat conform metodei A, este mai mare de 1 %. 2. Principiu 2.1. <i>Metoda A:</i> eșantionul se calcinează, cenușa se fierbe în acid clorhidric, iar reziduul insolubil se filtrează și se cântărește. 2.2. <i>Metoda B:</i> eșantionul se tratează cu acid clorhidric. Soluția se filtrează, reziduul se calcinează, iar cenușa astfel obținută se tratează conform metodei A. 3. Reactivi 3.1. Acid clorhidric 3 mol/litru. 3.2. Acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum). 3.3. Acid tricloracetic, soluție 1 % (greutate/volum). 4. Aparatură 4.1. Plită.	

N. DETERMINAREA FOSFORULUI TOTAL

Fosforul total se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de EN 15510 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES; sau

— metoda de analiză prevăzută de EN 15621 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau

— metoda fotometrică, astfel cum este descrisă în continuare.

METODA FOTOMETRICĂ

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de fosfor total. Ea este indicată în special pentru analiza produselor sărace în fosfor. În anumite cazuri (produs bogat în fosfor), se poate utiliza o metodă gravimetrică.

2. Principiu

Eșantionul se mineralizează, fie prin combustie uscată (în cazul furajelor organice), fie prin dizolvare în mediu acid (în cazul furajelor combinate conținând minerale și al celor lichide), iar apoi se introduce în soluție acidă. Soluția se tratează cu reactivul molibdovanadat. Densitatea optică a soluției galbene astfel formate se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm.

3. Reactivi

3.1. Carbonat de calciu.

3.2. Acid clorhidric, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (aproximativ 6 mol/litru).

3.3. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,38-1,42$ g/ml.

4.2. Cuptor electric cu muflă, dotat cu termostat.

4.3. Creuzete pentru calcinare fabricate din silice, porțelan sau platină, de formă rectangulară (aproximativ $60 \times 40 \times 25$ mm) sau circulară (diametru: 60-75 mm, înălțime: 20-40 mm).

4.4. Filtre lipsite de cenușă

5. Procedura

5.1. Metoda A:

Eșantionul se calcinează prin metoda descrisă la determinarea cenușii brute. Se poate utiliza și cenușă obținută din analiza respectivă.

Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se aduce lent la fierbere și se fierbe încet timp de 15 minute. Soluția caldă se filtrează printr-un filtru de hârtie lipsit de cenușă, iar reziduul se spală cu apă caldă până când reacția acidă nu mai este vizibilă. Filtrul care conține reziduul se usucă și se calcinează într-un creuzet tarat, la o temperatură de minimum 550°C și maximum 700°C . Se lasă să se răcească într-un desicator și se cântărește.

5.2. Metoda B

Se cântăresc 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc într-un pahar de laborator de 250-400 ml. Se adaugă succesiv 25 ml apă și 25 ml acid clorhidric (punctul 3.1), se amestecă și se așteaptă ca efervescența să înceteze. Se adaugă încă 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1). Se așteaptă ca degajarea de gaz să înceteze, apoi se introduce paharul de laborator într-o baie de apă la temperatura de fierbere și se menține acolo timp de 30 de minute sau, dacă este necesar, mai mult, pentru ca amidonul eventual prezent să se hidrolizeze complet. Se filtrează până este încă cald, printr-un filtru lipsit de cenușă, iar filtrul se spală în 50 ml de apă caldă (a se vedea observația 7). Se introduce filtrul care conține reziduul într-un creuzet pentru calcinare, se usucă și

3.5. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml. 3.6. Reactiv molibdovanadat: se amestecă 200 ml de soluție de heptamolibdat de amoniu (punctul 3.6.1), 200 ml de soluție de monovanadat de amoniu (punctul 3.6.2) și 134 ml de acid azotic (punctul 3.4) într-un balon gradat de 1 litru. Se completează până la volum cu apă. 3.6.1. Soluție de heptamolibdat de amoniu: se dizolvă în apă fierbinte 100 g de heptamolibdat de amoniu (NH_4)$6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Se adaugă 10 ml de amoniac (concentrație 0,91 g/ml) și se completează cu apă până la 1 litru. 3.6.2. Soluție de monovanadat de amoniu: se dizolvă 2,35 g de monovanadat de amoniu NH_4VO_3 în 400 ml de apă fierbinte. Amestecând constant, se adaugă lent 20 ml de acid azotic diluat [7 ml de HNO_3 (punctul 3.4) + 13 ml de H_2O] și se completează cu apă până la 1 litru. 3.7. Soluție etalon de 1 mg de fosfor per ml: se dizolvă 4,387 g de fosfat diacid de potasiu KH_2PO_4 în apă. Se completează cu apă până la 1 litru. 4. Aparatură 4.1. Creuzete pentru calcinare din silice, porțelan sau platină. 4.2. Cuptor cu muflă electric, dotat cu termostat reglat la 550 °C. 4.3. Flacon Kjeldahl de 250 ml. 4.4. Baloane gradate și pipete de precizie. 4.5. Spectrofotometru. 4.6. Eprubete cu diametru de aproximativ 16 mm, cu dopuri gradate la un diametru de 14,5 mm; capacitate: 25-30 ml. 5. Procedura 5.1. <i>Prepararea soluției</i> În funcție de natura eșantionului, soluția se prepară astfel cum se indică la punctul 5.1.1 sau 5.1.2. 5.1.1. Procedura uzuală Se cântărește 1 g de eșantion, sau mai mult, cu o abatere de 1 mg. Se introduce eșantionul de testat într-un flacon Kjeldahl, se	se calcinează la o temperatură de minimum 550 °C și maximum 700 °C. Se introduce cenușa într-un pahar de laborator de 250-400 ml, utilizând 75 ml de acid clorhidric (punctul 3.1); se continuă astfel cum se descrie la punctul 5.1, al doilea paragraf. 6. Calculul rezultatelor Se calculează greutatea reziduului prin deducerea tarei. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. 7. Observație Dacă filtrarea se dovedește dificilă, se reia analiza, înlocuind cei 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) cu 50 ml de acid tricloracetic, soluție 20 % (greutate/volum) (punctul 3.2) și spălând filtrul într-o soluție caldă de acid tricloracetic 1 % (punctul 3.3). N. DETERMINAREA FOSFORULUI TOTAL Fosforul total se determină prin: — metoda de analiză prevăzută de SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES; sau — metoda de analiză prevăzută de SM EN 15621:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau — metoda fotometrică, astfel cum este descrisă în continuare. <i>METODA FOTOMETRICĂ</i> 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea în furaje a conținutului de fosfor total. Ea este indicată în special pentru analiza produselor sărace în fosfor. În anumite cazuri (produs bogat în fosfor), se poate utiliza o metodă gravimetrică.	

adaugă 20 ml de acid sulfuric (punctul 3.5), se agită pentru a impregna complet substanța cu acid și pentru a preveni ca substanța să adere pe pereții flaconului, se încălzește și se menține la punctul de fierbere timp de 10 minute. Se lasă să se răcească ușor, se adaugă 2 ml de acid azotic (punctul 3.4), se încălzește ușor, se lasă să se răcească ușor, se mai adaugă puțin acid azotic (punctul 3.4) și se readuce la punctul de fierbere. Se repetă această procedură până se obține o soluție incoloră. Se răcește, se adaugă puțină apă, se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml clătind flaconul Kjeldahl cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. 5.1.2. Eșantioane care conțin substanțe organice și sunt lipsite de fosfați diacizi de calciu și magneziu Se cântăresc aproximativ 2,5 g de eșantion cu abatere de 1 mg într-un creuzet de calcinare. Se amestecă eșantionul de testat cu 1 g de carbonat de calciu (punctul 3.1) până când se obține un amestec complet omogen. Se calcinează în cuptor la 550 °C până se obține o cenușă albă sau gri (o cantitate mică de cărbune se ignoră). Se transferă cenușa într-un pahar de laborator de 250 ml. Se adaugă 20 ml de apă și acid clorhidric (punctul 3.2) până când efervescența încetează. Se adaugă încă 10 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se așază paharul de laborator pe o baie de nisip și se evaporă până la uscare, pentru a face silica insolubilă. Se redizolvă reziduul în 10 ml de acid azotic (punctul 3.3) și se fierbe pe baia de nisip sau pe o plită timp de 5 minute, fără a se evapora până la uscare. Se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml, clătind paharul de mai multe ori cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. 5.2. Apariția colorației și măsurarea densității optice Se diluează o parte alicotă de filtrat obținut ca la punctul 5.1.1 sau 5.1.2 pentru a obține o concentrație de fosfor de maximum 40 µg/ml. Se introduc 10 ml din această soluție într-o eprubetă	2. Principiu Eșantionul se mineralizează, fie prin combustie uscată (în cazul furajelor organice), fie prin dizolvare în mediu acid (în cazul furajelor combinate conținând minerale și al celor lichide), iar apoi se introduce în soluție acidă. Soluția se tratează cu reactivul molibdovanadat. Densitatea optică a soluției galbene astfel formate se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm. 3. Reactivi 3.1. Carbonat de calciu. 3.2. Acid clorhidric, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (aproximativ 6 mol/litru). 3.3. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml. 3.4. Acid azotic, $\rho_{20} = 1,38-1,42$ g/ml. 3.5. Acid sulfuric, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml. 3.6. Reactiv molibdovanadat: se amestecă 200 ml de soluție de heptamolibdat de amoniu (punctul 3.6.1), 200 ml de soluție de monovanadat de amoniu (punctul 3.6.2) și 134 ml de acid azotic (punctul 3.4) într-un balon gradat de 1 litru. Se completează până la volum cu apă. 3.6.1. Soluție de heptamolibdat de amoniu: se dizolvă în apă fierbinte 100 g de heptamolibdat de amoniu (NH_4) $6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Se adaugă 10 ml de amoniac (concentrație 0,91 g/ml) și se completează cu apă până la 1 litru. 3.6.2. Soluție de monovanadat de amoniu: se dizolvă 2,35 g de monovanadat de amoniu NH_4VO_3 în 400 ml de apă fierbinte. Amestecând constant, se adaugă lent 20 ml de acid azotic diluat [7 ml de HNO_3 (punctul 3.4) + 13 ml de H_2O] și se completează cu apă până la 1 litru. 3.7. Soluție etalon de 1 mg de fosfor per ml: se dizolvă 4,387 g de fosfat diacid de potasiu KH_2PO_4 în apă. Se completează cu apă până la 1 litru. 4. Aparatură 4.1. Creuzete pentru calcinare din silica, porțelan sau platină.	

(punctul 4.6) și se adaugă 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm, prin comparație cu o soluție obținută prin adăugarea de 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6) la 10 ml de apă. 5.3. Curba de calibrare Din soluția etalon (punctul 3.7) se prepară soluții care conțin 5, 10, 20, 30 și 40 µg de fosfor per ml, respectiv. Se iau 10 ml din fiecare din aceste soluții și se adaugă la 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară astfel cum se indică la punctul 5.2. Se trasează curba de calibrare prin înscrierea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile corespunzătoare de fosfor. Pentru concentrații cuprinse între 0 și 40 µg/ml, curba va fi liniară. 6. Calculul rezultatelor Cantitatea de fosfor din eșantionul de testat se determină prin utilizarea curbei de calibrare. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. <i>Repetabilitate</i> Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășesc: — 3 %, relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fosfor mai mic de 5 %; — 0,15 % în valoare absolută, pentru un conținut de fosfor egal sau mai mare de 5 %. O. DETERMINAREA CLORULUI DIN CLORURI 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea cantității de clor din clorurile solubile în apă, exprimate convențional ca clorură de sodiu. Este aplicabilă tuturor furajelor.	4.2. Cuptor cu muflă electric, dotat cu termostat reglat la 550 °C. 4.3. Flacon Kjeldahl de 250 ml. 4.4. Baloane gradate și pipete de precizie. 4.5. Spectrofotometru. 4.6. Eprubete cu diametru de aproximativ 16 mm, cu dopuri gradate la un diametru de 14,5 mm; capacitate: 25-30 ml. 5. Procedura 5.1. Prepararea soluției În funcție de natura eșantionului, soluția se prepară astfel cum se indică la punctul 5.1.1 sau 5.1.2. 5.1.1. Procedura uzuală Se cântărește 1 g de eșantion, sau mai mult, cu o abatere de 1 mg. Se introduce eșantionul de testat într-un flacon Kjeldahl, se adaugă 20 ml de acid sulfuric (punctul 3.5), se agită pentru a impregna complet substanța cu acid și pentru a preveni ca substanța să adere pe pereții flaconului, se încălzește și se menține la punctul de fierbere timp de 10 minute. Se lasă să se răcească ușor, se adaugă 2 ml de acid azotic (punctul 3.4), se încălzește ușor, se lasă să se răcească ușor, se mai adaugă puțin acid azotic (punctul 3.4) și se readuce la punctul de fierbere. Se repetă această procedură până se obține o soluție incoloră. Se răcește, se adaugă puțină apă, se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml clătind flaconul Kjeldahl cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. 5.1.2. Eșantioane care conțin substanțe organice și sunt lipsite de fosfați diacizi de calciu și magneziu Se cântăresc aproximativ 2,5 g de eșantion cu abatere de 1 mg într-un creuzet de calcinare. Se amestecă eșantionul de testat cu 1 g de carbonat de calciu (punctul 3.1) până când se obține un amestec complet omogen. Se calcinează în cuptor la 550 °C până se obține o cenușă albă sau gri (o cantitate	

2. Principiu Clorurile se dizolvă în apă. Dacă produsul conține materii organice, se limpezește. Soluția se acidifică ușor cu acid azotic, iar clorurile precipită sub formă de clorură de argint cu ajutorul unei soluții de nitrat de argint. Excesul de nitrat de argint se titrează cu o soluție de tiocianat de amoniu, prin metoda Volhard. 3. Reactivi 3.1. Soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/litru. 3.2. Soluție de nitrat de argint 0,1 mol/litru. 3.3. Soluție saturată de sulfat feric de amoniu (NH₄)Fe(SO₄)₂. 3.4. Acid azotic, concentrație: 1,38 g/ml. 3.5. Eter dietilic. 3.6. Acetonă. 3.7. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn (CH₃COO)₂·2H₂O și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.8. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, K₄Fe(CN)₆·3H₂O în apă. Se completează cu apă până la 100 ml. 3.9. Cărbune activ, lipsit de cloruri și fără a le absorbi. 4. Aparatură Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm. 5. Procedura 5.1. Prepararea soluției În funcție de natura eșantionului, se prepară o soluție conform indicațiilor de la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3. În același timp, se efectuează un <i>test martor</i> fără eșantionul de analizat. 5.1.1. Eșantioane fără materii organice Se cântăresc maximum 10 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, care conțin maximum 3 g de clor sub formă de cloruri. Se introduc, împreună cu 400 ml de apă, într-un balon gradat de	mică de cărbune se ignoră). Se transferă cenușa într-un pahar de laborator de 250 ml. Se adaugă 20 ml de apă și acid clorhidric (punctul 3.2) până când efervescența încetează. Se adaugă încă 10 ml de acid clorhidric (punctul 3.2). Se așază paharul de laborator pe o baie de nisip și se evaporă până la uscare, pentru a face silica insolubilă. Se redizolvă reziduul în 10 ml de acid azotic (punctul 3.3) și se fierbe pe baia de nisip sau pe o plită timp de 5 minute, fără a se evapora până la uscare. Se decantează lichidul într-un balon gradat de 500 ml, clătind paharul de mai multe ori cu apă fierbinte. Se lasă să se răcească, se completează până la volum cu apă, se omogenizează și se filtrează. 5.2. Apariția colorației și măsurarea densității optice Se diluează o parte alicotă de filtrat obținut ca la punctul 5.1.1 sau 5.1.2 pentru a obține o concentrație de fosfor de maximum 40 μg/ml. Se introduc 10 ml din această soluție într-o eprubetă (punctul 4.6) și se adaugă 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară cu un spectrofotometru la 430 nm, prin comparație cu o soluție obținută prin adăugarea de 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6) la 10 ml de apă. 5.3. Curba de calibrare Din soluția etalon (punctul 3.7) se prepară soluții care conțin 5, 10, 20, 30 și 40 μg de fosfor per ml, respectiv. Se iau 10 ml din fiecare din aceste soluții și se adaugă la 10 ml de reactiv molibdovanadat (punctul 3.6). Se omogenizează și se lasă să stea timp de cel puțin 10 minute la 20 °C. Densitatea optică se măsoară astfel cum se indică la punctul 5.2. Se trasează curba de calibrare prin înscrierea grafică a densităților optice în raport cu cantitățile corespunzătoare de fosfor. Pentru concentrații cuprinse între 0 și 40 μg/ml, curba va fi liniară. 6. Calculul rezultatelor	

500 ml la aproximativ 20 °C. Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează. 5.1.2. Eșantioane care conțin materii organice, exceptând produsele menționate la punctul 5.1.3 Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc, împreună cu 1 g de cărbune activ, într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml apă la aproximativ 20 °C și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.7), se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.8). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează. 5.1.3. Furaje preparate termic, turte și făină de in, produse bogate în făină de in și alte produse bogate în mucilagii sau în substanțe coloidale (de exemplu amidon dextrinat) Se prepară soluția astfel cum se descrie la punctul 5.1.2, dar nu se filtrează. Se decantează (dacă este necesar, se centrifughează), se îndepărtează 100 ml lichid supernatant și se transferă într-un flacon de măsurare de 200 ml. Se amestecă cu acetonă (punctul 3.6) și se aduce la volum cu acest solvent, se omogenizează și se filtrează. 5.2. Titrarea Cu ajutorul unei pipete, se transferă într-un flacon Erlenmeyer o cantitate cuprinsă între de 25 și 100 ml de filtrat (în funcție de conținutul anticipat de clor), obținut astfel cum se descrie la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3. Porția alicotă nu trebuie să conțină mai mult de 150 mg de clor (Cl). Dacă este necesar, se diluează cu maximum 50 ml de apă, se adaugă 5 ml acid azotic (punctul 3.4), 2 ml de soluție saturată de sulfat feric de amoniu (punctul 3.3) și două picături de soluție de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) transferată cu ajutorul unei biurete umplute până la gradația zero. Cu ajutorul unei biurete, se transferă soluția de nitrat de argint (punctul 3.2) astfel încât să se obțină un exces de 5 ml. Se adaugă 5 ml de eter dietilic (punctul 3.5) și se agită	Cantitatea de fosfor din eșantionul de testat se determină prin utilizarea curbei de calibrare. Rezultatul se exprimă ca procent din eșantion. <i>Repetabilitate</i> Diferența dintre rezultatele obținute în două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu depășesc: — 3 %, relativ la rezultatul mai mare, pentru un conținut de fosfor mai mic de 5 %; — 0,15 % în valoare absolută, pentru un conținut de fosfor egal sau mai mare de 5 %. O. DETERMINAREA CLORULUI DIN CLORURI 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea cantității de clor din clorurile solubile în apă, exprimate convențional ca clorură de sodiu. Este aplicabilă tuturor furajelor. 2. Principiu Clorurile se dizolvă în apă. Dacă produsul conține materii organice, se limpezește. Soluția se acidifică ușor cu acid azotic, iar clorurile precipită sub formă de clorură de argint cu ajutorul unei soluții de nitrat de argint. Excesul de nitrat de argint se titrează cu o soluție de tiocianat de amoniu, prin metoda Volhard. 3. Reactivi 3.1. Soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/litru. 3.2. Soluție de nitrat de argint 0,1 mol/litru. 3.3. Soluție saturată de sulfat feric de amoniu (NH₄)Fe(SO₄)₂. 3.4. Acid azotic, concentrație: 1,38 g/ml. 3.5. Eter dietilic. 3.6. Acetonă. 3.7. Soluție Carrez I: se dizolvă 21,9 g de acetat de zinc, Zn (CH₃COO)₂·2H₂O și 3 g de acid acetic glacial în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.	

puternic pentru a coagula precipitatul. Excesul de nitrat de argint se titrează cu soluția de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) până când colorația maro-roșcat a persistat timp de un minut.

6. **Calculul rezultatelor**

Cantitatea de clor (X), exprimată ca % de clorură de sodiu, se calculează cu ajutorul următoarei formule:

$$X = \frac{5,845 (V_1 - V_2)}{m}$$

unde:

V = ml de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l adăugată;

¹
V = ml de soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/l utilizată la
² titrare;

m = g din greutatea eșantionului în partea alicotă.

Dacă testul martor indică un consum de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l, se deduce această valoare din volum ($V_1 - V_2$).

7. **Observații**

7.1. Titrarea se poate face și prin potențimetrie sau amperometrie.

7.2. În cazul produselor foarte bogate în uleiuri și grăsimi, se procedează mai întâi la o degresare cu eter dietilic sau cu eter de petrol.

7.3. În cazul făinii de pește, titrarea se poate efectua prin metoda Mohr.

▼M10

P. DETERMINAREA CARBONAȚILOR

1. **Obiectiv și domeniu de aplicare**

Metoda permite dozarea carbonaților, în mod convențional exprimați în carbonat de calciu, din furaje cu excepția furajelor în care este prezent carbonatul de fier.

2. **Principiu**

Carbonații se descompun în acid clorhidric; dioxidul de carbon eliberat se colectează într-un tub gradat, iar volumul său se

3.8. Soluție Carrez II: se dizolvă 10,6 g de ferocianură de potasiu, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ în apă. Se completează cu apă până la 100 ml.

3.9. Cărbune activ, lipsit de cloruri și fără a le absorbi.

4. **Aparatură**

Mixer (agitator): aproximativ 35-40 rpm.

5. **Procedura**

5.1. **Prepararea soluției**

În funcție de natura eșantionului, se prepară o soluție conform indicațiilor de la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3.

În același timp, se efectuează un *test martor* fără eșantionul de analizat.

5.1.1. **Eșantioane fără materii organice**

Se cântăresc maximum 10 g de eșantion cu o abatere de 1 mg, care conțin maximum 3 g de clor sub formă de cloruri. Se introduc, împreună cu 400 ml de apă, într-un balon gradat de 500 ml la aproximativ 20 °C. Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

5.1.2. **Eșantioane care conțin materii organice, exceptând produsele menționate la punctul 5.1.3**

Se cântăresc aproximativ 5 g de eșantion cu o abatere de 1 mg și se introduc, împreună cu 1 g de cărbune activ, într-un balon gradat de 500 ml. Se adaugă 400 ml apă la aproximativ 20 °C și 5 ml de soluție Carrez I (punctul 3.7), se amestecă timp de 30 de secunde, apoi se adaugă 5 ml de soluție Carrez II (punctul 3.8). Se amestecă timp de 30 de minute în agitator, se aduce la volum, se omogenizează și se filtrează.

5.1.3. **Furaje preparate termic, turte și făină de in, produse bogate în făină de in și alte produse bogate în mucilagii sau în substanțe coloidale (de exemplu amidon dextrinat)**

Se prepară soluția astfel cum se descrie la punctul 5.1.2, dar nu se filtrează. Se decantează (dacă este necesar, se

compară cu cel eliberat în aceleași condiții de o cantitate cunoscută de carbonat de calciu.

3. **Reactivi**

3.1. Acid clorhidric, densitate 1,10 g/ml.

3.2. Carbonat de calciu pur.

3.3. Acid sulfuric, aproximativ 0,05 mol/litru, colorat cu roșu de metil.

4. **Aparatură**

Aparatul Scheibler-Dietrich (a se vedea schema din apendice) sau aparatură echivalentă (calcimetru).

5. **Procedură**

În funcție de conținutul de carbonați al eșantionului, se cântărește o porție de eșantion conform indicațiilor de mai jos:

(a)

0,5 g pentru produsele care conțin 50-100 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;

(b)

1 g pentru produsele care conțin 40-50 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu;

(c)

2-3 g pentru alte produse.

Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) la porția de eșantion pentru a descompune carbonații prezenți. Volumul de dioxid de carbon se măsoară cu ajutorul aparatului Scheibler-Dietrich sau al unei aparaturi echivalente (calcimetru) și se compară cu volumul de dioxid de carbon produs de 0,5 g de carbonat de calciu pur (punctul 3.2 de mai sus).

Toate determinările se efectuează în aceleași condiții pentru a se evita corectarea diferențelor de temperatură și presiune. Determinarea trebuie efectuată, de preferință, într-o încăpere cu temperatură controlată.

Procedura de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich este descrisă în detaliu în apendice.

6. **Calculul rezultatelor**

centrifughează), se îndepărtează 100 ml lichid supernatant și se transferă într-un flacon de măsurare de 200 ml. Se amestecă cu acetonă (punctul 3.6) și se aduce la volum cu acest solvent, se omogenizează și se filtrează.

5.2. **Titrare**

Cu ajutorul unei pipete, se transferă într-un flacon Erlenmeyer o cantitate cuprinsă între de 25 și 100 ml de filtrat (în funcție de conținutul anticipat de clor), obținut astfel cum se descrie la punctul 5.1.1, 5.1.2 sau 5.1.3. Porția alicotă nu trebuie să conțină mai mult de 150 mg de clor (Cl). Dacă este necesar, se diluează cu maximum 50 ml de apă, se adaugă 5 ml acid azotic (punctul 3.4), 2 ml de soluție saturată de sulfat feric de amoniu (punctul 3.3) și două picături de soluție de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) transferată cu ajutorul unei biurete umplute până la gradația zero. Cu ajutorul unei biurete, se transferă soluția de nitrat de argint (punctul 3.2) astfel încât să se obțină un exces de 5 ml. Se adaugă 5 ml de eter dietilic (punctul 3.5) și se agită puternic pentru a coagula precipitatul. Excesul de nitrat de argint se titrează cu soluția de tiocianat de amoniu (punctul 3.1) până când colorația maro-roșcat a persistat timp de un minut.

6. **Calculul rezultatelor**

Cantitatea de clor (X), exprimată ca % de clorură de sodiu, se calculează cu ajutorul următoarei formule:

$$X = \frac{5,845 (V_1 - V_2)}{m}$$

unde:

V_1 = ml de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l adăugată;

V_2 = ml de soluție de tiocianat de amoniu 0,1 mol/l utilizată la titrare;

m = g din greutatea eșantionului în partea alicotă.

Conținutul de carbonați, exprimați drept carbonat de calciu pur, se calculează prin utilizarea următoarei formule:

X =	$V \times 100$
	$\frac{V_1 \times}{2m}$

unde:
X=% (g/g) de carbonați în eșantioane, exprimați drept carbonat de calciu;
V = ml de CO₂ eliberat de porția de eșantion;
V₁ = ml de CO₂ eliberat de 0,5 g de CaCO₃;
m = greutatea, în grame, a porției de eșantion.

7. *Observații*

7.1. În cazul în care se utilizează aparatul Scheibler-Dietrich, iar eșantionul cântărește mai mult de 2 g, se introduc mai întâi 15 ml de apă distilată în flacon (punctul 4 din schema din appendicele de mai jos) și se amestecă înainte de începerea testului prin adăugarea de acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus). În testul de control se utilizează același volum de apă distilată.
7.2. Dacă aparatul utilizat are un volum diferit de cel al aparatului Scheibler-Dietrich, porțiile prelevate din eșantion și din substanța de control, precum și calculul, trebuie adaptate corespunzător.

Apendice

Procedura detaliată de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich

Porția de eșantion se introduce în flaconul special (punctul 4 din schemă) al aparatului, dotat cu un mic tub din material

Dacă testul martor indică un consum de soluție de nitrat de argint 0,1 mol/l, se deduce această valoare din volum (V₁ – V₂).

7. *Observații*

7.1. Titrarea se poate face și prin potențimetrie sau amperometrie.
7.2. În cazul produselor foarte bogate în uleiuri și grăsimi, se procedează mai întâi la o degresare cu eter dietilic sau cu eter de petrol.
7.3. În cazul făinii de pește, titrarea se poate efectua prin metoda Mohr.

P. DETERMINAREA CARBONAȚILOR

1. *Obiectiv și domeniu de aplicare*

Metoda permite dozarea carbonaților, în mod convențional exprimați în carbonat de calciu, din furaje cu excepția furajelor în care este prezent carbonatul de fier.

2. *Principii*

Carbonații se descompun în acid clorhidric; dioxidul de carbon eliberat se colectează într-un tub gradat, iar volumul său se compară cu cel eliberat în aceleași condiții de o cantitate cunoscută de carbonat de calciu.

3. *Reactivi*

3.1. Acid clorhidric, densitate 1,10 g/ml.
3.2. Carbonat de calciu pur.
3.3. Acid sulfuric, aproximativ 0,05 mol/litru, colorat cu roșu de metil.

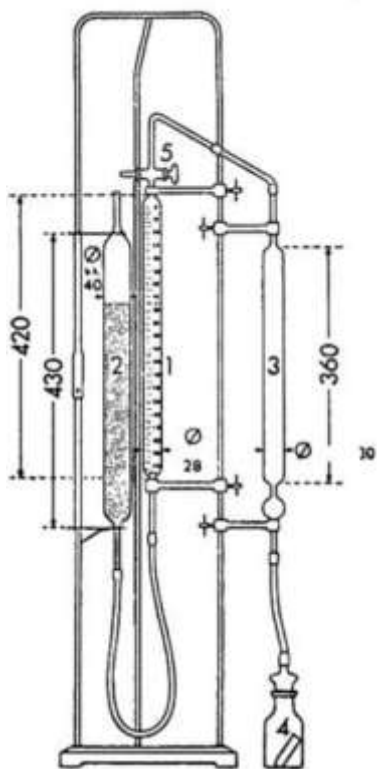
4. *Aparatură*

Aparatul Scheibler-Dietrich (a se vedea schema din appendice) sau aparatură echivalentă (calcimetru).

5. *Procedură*

În funcție de conținutul de carbonați al eșantionului, se cântărește o porție de eșantion conform indicațiilor de mai jos:

indestructibil care conține 10 ml acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus), apoi se conectează flaconul la aparat. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) astfel încât tubul gradat (punctul 1 din schemă) să se conecteze cu exteriorul. Cu ajutorul unui tub mobil (punctul 2 din schemă), care este umplut cu acid sulfuric colorat (punctul 3.3 de mai sus) și este conectat la tubul gradat (punctul 1 din schemă) se aduce nivelul lichidului la gradația zero. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) în așa fel încât să se asigure comunicația între tuburi (punctele 1 și 3 din schemă) și se verifică nivelul zero. Se lasă să se prelingă lent acidul clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) pe porția de eșantion înclinând flaconul special (punctul 4 din schemă). Se egalizează presiunea lăsând în jos tubul mobil (punctul 2 din schemă). Se agită flaconul special (punctul 4 din schemă) până la oprirea completă a degajării dioxidului de carbon. Se restabilește presiunea, readucând lichidele la același nivel în tuburi (punctele 1 și 2 din schemă). După câteva minute, când volumul de gaz a devenit constant, se face citirea. Se efectuează un test de control, în aceleași condiții, cu 0,5 g de carbonat de calciu (punctul 3.2 de mai sus). <i>APARATUL SCHEIBLER-DIETRICH PENTRU DETERMINAREA CO₂</i>	(a) 0,5 g pentru produsele care conțin 50-100 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu; (b) 1 g pentru produsele care conțin 40-50 % carbonați, exprimați ca și carbonat de calciu; (c) 2-3 g pentru alte produse. Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) la porția de eșantion pentru a descompune carbonații prezenți. Volumul de dioxid de carbon se măsoară cu ajutorul aparatului Scheibler-Dietrich sau al unei aparaturi echivalente (calcimetru) și se compară cu volumul de dioxid de carbon produs de 0,5 g de carbonat de calciu pur (punctul 3.2 de mai sus). Toate determinările se efectuează în aceleași condiții pentru a se evita corectarea diferențelor de temperatură și presiune. Determinarea trebuie efectuată, de preferință, într-o încăpere cu temperatură controlată. Procedura de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich este descrisă în detaliu în apendice. 6. <i>Calculul rezultatelor</i> Conținutul de carbonați, exprimați drept carbonat de calciu pur, se calculează prin utilizarea următoarei formule: <table><tr><td rowspan="2">X =</td><td>V ×100</td></tr><tr><td>V₁ × 2m</td></tr></table> unde: X=% (g/g) de carbonați în eșantioane, exprimați drept carbonat de calciu; V = ml de CO₂ eliberat de porția de eșantion; V₁ = ml de CO₂ eliberat de 0,5 g de CaCO₃; m = greutatea, în grame, a porției de eșantion. 7. <i>Observații</i>	X =	V ×100	V ₁ × 2m	
X =	V ×100				
	V ₁ × 2m				



(Dimensiuni în mm)

▼ M9

7.1. În cazul în care se utilizează aparatul Scheibler-Dietrich, iar eșantionul cântărește mai mult de 2 g, se introduc mai întâi 15 ml de apă distilată în flacon (punctul 4 din schema din apendicele de mai jos) și se amestecă înainte de începerea testului prin adăugarea de acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus). În testul de control se utilizează același volum de apă distilată.

7.2. Dacă aparatul utilizat are un volum diferit de cel al aparatului Scheibler-Dietrich, porțiile prelevate din eșantion și din substanța de control, precum și calculul, trebuie adaptate corespunzător.

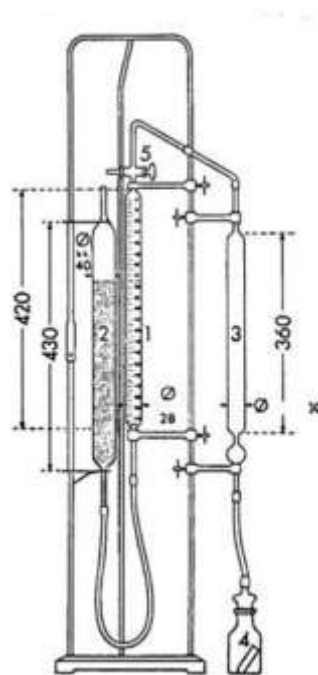
Apendice

Procedura detaliată de utilizare a aparatului Scheibler-Dietrich

Porția de eșantion se introduce în flaconul special (punctul 4 din schemă) al aparatului, dotat cu un mic tub din material indestructibil care conține 10 ml acid clorhidric (punctul 3.1 de mai sus), apoi se conectează flaconul la aparat. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) astfel încât tubul gradat (punctul 1 din schemă) să se conecteze cu exteriorul. Cu ajutorul unui tub mobil (punctul 2 din schemă), care este umplut cu acid sulfuric colorat (punctul 3.3 de mai sus) și este conectat la tubul gradat (punctul 1 din schemă) se aduce nivelul lichidului la gradația zero. Se întoarce robinetul cu trei căi (punctul 5 din schemă) în așa fel încât să se asigure comunicația între tuburi (punctele 1 și 3 din schemă) și se verifică nivelul zero.

Se lasă să se prelingă lent acidul clorhidric (punctul 3.1 de mai sus) pe porția de eșantion înclinând flaconul special (punctul 4 din schemă). Se egalizează presiunea lăsând în jos tubul mobil (punctul 2 din schemă). Se agită flaconul special (punctul 4 din schemă) până la oprirea completă a degajării dioxidului de carbon.

Se restabilește presiunea, readucând lichidele la același nivel în tuburi (punctele 1 și 2 din schemă). După câteva minute, când volumul de gaz a devenit constant, se face citirea.
Se efectuează un test de control, în aceleași condiții, cu 0,5 g de carbonat de calciu (punctul 3.2 de mai sus).
APARATUL SCHEIBLER-DIETRICH PENTRU DETERMINAREA CO₂



ANEXA IV
METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLAREA NIVELULUI AUTORIZAT DE ADITIVI DIN FURAJE
A. DETERMINAREA VITAMINEI A
Vitamina A se determină prin:

Anexă nr.4
cu privire la aprobarea
metodelor de analiză pentru
controlul oficial al furajelor

Compatibil

Metoda de analiză prevăzută de EN 17547 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea conţinutului de vitamine A, E şi D ([19](#)) – Metodă care utilizează extracţia în fază solidă (SPE) şi cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescenţă, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos.

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină A (retinol) din furaje. Vitamina A include alcoolul all-*trans*-retinil şi izomerii săi *cis*, care se determină prin această metodă. Conţinutul de vitamină A se exprimă în unităţi internaţionale (UI) per kg O UI corespunde activităţii a 0,300 µg de alcool all-*trans*-vitamină A sau a 0,344 µg all-*trans*-vitamină A acetat sau 0,550 µg all-*trans*-vitamină A palmitat.

Limita de cuantificare este 2 000 UI de vitamină A/kg.

2. Principiu

Eşantionul se hidrolizează cu o soluţie de hidroxid de potasiu etanolic, iar vitamina A se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol şi, dacă este necesar, se diluează până la concentraţia necesară. Conţinutul de vitamină A se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector de UV sau de fluorescenţă. Parametrii cromatografiei se aleg astfel încât să nu existe separaţie între alcoolul all-*trans*-vitamina A şi izomerii săi *cis*.

3. Reactivi

3.1. Etanol, σ = 96 %

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

3.3. Metanol

3.4. Soluţie de hidroxid de potasiu, c = 50 g/100 ml

METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLAREA NIVELULUI AUTORIZAT DE ADITIVI DIN FURAJE

A. DETERMINAREA VITAMINEI A

Vitamina A se determină prin:

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17547:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea conţinutului de vitamine A, E şi D ([19](#)) – Metodă care utilizează extracţia în fază solidă (SPE) şi cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC); sau

— prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescenţă, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos.

1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină A (retinol) din furaje. Vitamina A include alcoolul all-*trans*-retinil şi izomerii săi *cis*, care se determină prin această metodă. Conţinutul de vitamină A se exprimă în unităţi internaţionale (UI) per kg O UI corespunde activităţii a 0,300 µg de alcool all-*trans*-vitamină A sau a 0,344 µg all-*trans*-vitamină A acetat sau 0,550 µg all-*trans*-vitamină A palmitat. Limita de cuantificare este 2 000 UI de vitamină A/kg.

2. Principiu

Eşantionul se hidrolizează cu o soluţie de hidroxid de potasiu etanolic, iar vitamina A se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol şi, dacă este necesar, se diluează până la concentraţia necesară. Conţinutul de vitamină A se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector de UV sau de fluorescenţă. Parametrii cromatografiei se aleg astfel încât să nu existe separaţie între alcoolul all-*trans*-vitamina A şi izomerii săi *cis*.

3. Reactivi

3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (a se vedea observațiile de la punctul 7.7) 3.6. Sulfură de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$) 3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ în glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8) 3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1) 3.8. 2-propanol 3.9. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite. 3.10. Azot, lipsit de oxigen 3.11. All-<i>trans</i>-vitamină A acetat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu, $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$ 3.11.1. Soluție stoc de all-<i>trans</i>-vitamină A acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de vitamină A acetat (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.1. 3.12. All-<i>trans</i>-vitamină A palmitat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$ 3.12.1. Soluție stoc de all-<i>trans</i>-vitamină A palmitat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 80 mg de vitamină A palmitat (punctul 3.12) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.2. 3.13. 2,6-di-<i>terț</i>-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5) 4. Aparatură 4.1. Evaporator rotativ cu vid	3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$ 3.2. Eter de petrol, interval de fierbere $40\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$ 3.3. Metanol 3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, $c = 50 \text{ g/100 ml}$ 3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (a se vedea observațiile de la punctul 7.7) 3.6. Sulfură de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$) 3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ în glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8) 3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1) 3.8. 2-propanol 3.9. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite. 3.10. Azot, lipsit de oxigen 3.11. All-<i>trans</i>-vitamină A acetat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu, $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$ 3.11.1. Soluție stoc de all-<i>trans</i>-vitamină A acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de vitamină A acetat (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.1. 3.12. All-<i>trans</i>-vitamină A palmitat, extra pură, cu activitate certificată, de exemplu $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$ 3.12.1. Soluție stoc de all-<i>trans</i>-vitamină A palmitat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 80 mg de vitamină A palmitat (punctul 3.12) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în 2-propanol (punctul 3.8) și se completează până la semn cu același solvent. Concentrația nominală a acestei soluții este de 1 400 UI vitamină A per ml. Conținutul exact		

4.2. Sticlărie laborator brună 4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită. 4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml. 4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită. 4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită. 4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz 4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2) 4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție 4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, cu particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent (criteriu de performanță: un singur vârf pentru toți izomerii de retinol în condițiile HPLC). 4.5.2. Detector de UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă. 4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm. 4.7. Baie de apă cu agitator magnetic. 4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din: 4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite. 4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare. 5. Procedura <i>Notă:</i> Vitamina A este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în	se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.2. 3.13. 2,6-di-<i>terț</i>-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5) 4. Aparatură 4.1. Evaporator rotativ cu vid 4.2. Sticlărie laborator brună 4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită. 4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml. 4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită. 4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită. 4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz 4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2) 4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție 4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, cu particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent (criteriu de performanță: un singur vârf pentru toți izomerii de retinol în condițiile HPLC). 4.5.2. Detector de UV sau de fluorescență, cu ajustare variabilă a lungimii de undă. 4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm. 4.7. Baie de apă cu agitator magnetic. 4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din: 4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite.	

recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

5.1. Pregătirea eșantionului

Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina A. Nu se macină eșantionul (eșantioanele) în cazul în care distribuția granulometrică este adecvată (de exemplu, preamestecuri și aditivi furajeri).

5.2. Saponificarea

În funcție de conținutul de vitamină A, se cântăresc 2-25 g de eșantion cu o abatere de 1 mg într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1). În cazul concentrațiilor scăzute, greutatea eșantionului poate fi mărită pentru a avea suficiente particule în porțiunea de testare. Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.13), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la balon și acesta se scufundă într-o baie de apă cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei.

5.3. Extracție

Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție

4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare.

5. Procedura

Notă: Vitamina A este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul).

5.1. Pregătirea eșantionului

Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina A. Nu se macină eșantionul (eșantioanele) în cazul în care distribuția granulometrică este adecvată (de exemplu, preamestecuri și aditivi furajeri).

5.2. Saponificarea

În funcție de conținutul de vitamină A, se cântăresc 2-25 g de eșantion cu o abatere de 1 mg într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1). În cazul concentrațiilor scăzute, greutatea eșantionului poate fi mărită pentru a avea suficiente particule în porțiunea de testare. Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.13), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la balon și acesta se scufundă într-o baie de apă cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi

(punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute. 5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3) Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2). Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine. 5.3.2. Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8) Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol	se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei. 5.3. Extracție Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție (punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute. 5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3) Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2). Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50	

(punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare. Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat. 5.4. Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.10) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un jet de azot (punctul 3.10), iar reziduul se dizolvă imediat într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de vitamină A trebuie să fie cuprinsă în intervalul 5-30 UI/ml). 5.5. Determinarea prin HPLC Vitamina A se separă pe o coloană cu fază inversată C18 (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de UV (punctul 325 nm) sau un detector de fluorescență (excitație: 325 nm, emisie: 475 nm) (punctul 4.5.2). Se injectează o porție alicotă (de exemplu 20 μl) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.9). Se calculează înălțimea medie a vârfului (aria) mai multor injectări ale aceleiași soluții de eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor mai multor injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2). Condiții HPLC	ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine. 5.3.2. Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8) Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare. Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat. 5.4. Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.10) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un jet de azot (punctul 3.10), iar reziduul se dizolvă imediat într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de vitamină A trebuie să fie cuprinsă în intervalul 5-30 UI/ml).	

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.9):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/min
Detector (punctul 4.5.2):	detector de UV (punctul 325 nm) sau detector de fluorescență (excitație: 325 nm/emisie: 475 nm)

5.6. Calibrarea

5.6.1. Prepararea soluțiilor etalon de lucru

Se pipetează 20 ml de soluție stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) sau 20 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează astfel cum se descrie la punctul 5.2, dar fără a se adăuga BHT. În continuare se extrage cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.2). Se lasă să se evaporeze 100 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.10) și se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 560 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.3. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.5. Determinarea prin HPLC

Vitamina A se separă pe o coloană cu fază inversată C₁₈ (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de UV (punctul 325 nm) sau un detector de fluorescență (excitație: 325 nm, emisie: 475 nm) (punctul 4.5.2). Se injectează o porție alicotă (de exemplu 20 μl) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.9). Se calculează înălțimea medie a vârfului (aria) mai multor injectări ale aceleiași soluții de eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor mai multor injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2).

Condiții HPLC

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.9):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/min
Detector (punctul 4.5.2):	detector de UV (punctul 325 nm) sau detector de fluorescență (excitație: 325 nm/emisie: 475 nm)

5.6. Calibrarea

5.6.1. Prepararea soluțiilor etalon de lucru

Se pipetează 20 ml de soluție stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) sau 20 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon cu fund plat sau într-

Se pipetează 2,0 ml din această soluție etalon de lucru într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrația nominală a acestei soluții etalon de lucru diluate este de 56 UI de vitamină A per ml. 5.6.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 5,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru diluată într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt de 2,8, 5,6, 14,0 și respectiv 28,0 UI de vitamină A per ml. Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. Utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare ținând cont de rezultatele obținute cu soluția de control UV (punctul 5.6.3.3). 5.6.3. Standardizarea UV a soluțiilor etalon 5.6.3.1. Soluția stoc de vitamină A acetat Se pipetează 2,0 ml din soluția stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A acetat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm. Calculul conținutului de vitamină A:	un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează astfel cum se descrie la punctul 5.2, dar fără a se adăuga BHT. În continuare se extrage cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol (punctul 3.2). Se lasă să se evaporeze 100 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.10) și se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 560 UI vitamină A per ml. Conținutul exact se determină în conformitate cu indicațiile de la punctul 5.6.3.3. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare. Se pipetează 2,0 ml din această soluție etalon de lucru într-un balon gradat de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrația nominală a acestei soluții etalon de lucru diluate este de 56 UI de vitamină A per ml. 5.6.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 5,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru diluată într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt de 2,8, 5,6, 14,0 și respectiv 28,0 UI de vitamină A per ml. Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. Utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare ținând cont de rezultatele obținute cu soluția de control UV (punctul 5.6.3.3). 5.6.3. Standardizarea UV a soluțiilor etalon 5.6.3.1. Soluția stoc de vitamină A acetat	

UI vitamină A/ml = E₃₂₆ 19,0

$\left(E_{1\text{ cm}}^1\right)\%$ pentru vitamină A acetat = 1 530

5.6.3.2. Soluția stoc de vitamină A palmitat

Se pipetează 2,0 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la gradație cu propanol-2 (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A palmitat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm. Calculul conținutului de vitamină A:

UI vitamină A/ml = E₃₂₆ 19,0

$\left(E_{1\text{ cm}}^1\right)\%$ pentru vitamină A palmitat = 957

5.6.3.3. Soluția etalon de lucru de vitamină A

Se pipetează 3,0 ml din soluția etalon de lucru nediluată de vitamină A, preparată conform punctului 5.6.1, într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Se pipetează 5,0 ml din această soluție într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în

Se pipetează 2,0 ml din soluția stoc de vitamină A acetat (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A acetat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm. Calculul conținutului de vitamină A:

UI vitamină A/ml = E₃₂₆ 19,0

$\left(E_{1\text{ cm}}^1\right)\%$ pentru vitamină A acetat = 1 530

5.6.3.2. Soluția stoc de vitamină A palmitat

Se pipetează 2,0 ml de soluție stoc de vitamină A palmitat (punctul 3.12.1) într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la gradație cu propanol-2 (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 56 UI vitamină A per ml. Se pipetează 3,0 ml din această soluție diluată de vitamină A palmitat într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm. Calculul conținutului de vitamină A:

intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$UI \text{ vitamină A/ml} = E_{325} 18,30$$

$$\left(E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} \text{ pentru vitamină A alcool} = 18211\right)$$

6. *Calculul rezultatelor*

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de vitamină A ale soluției de eșantion se determină concentrația soluției de eșantion în UI/ml prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.2).

Conținutul w de vitamină A al eșantionului, în UI/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \text{ c } V_2 \text{ 1 000}}{V_1 \text{ m}} [\text{IU/kg}]$$

unde:

c=concentrația de vitamină A a soluției de eșantion (punctul 5.4), în UI/ml;

V₁=volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml;

V₂=volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml;

m = greutatea porțiunii de testat, în g.

7. *Observații*

7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină A poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC.

7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsime.

7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia.

$$UI \text{ vitamină A/ml} = E_{326} 19,0$$

$$\left(E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} \text{ pentru vitamină A palmitat} = 95\right)$$

5.6.3.3. *Soluția etalon de lucru de vitamină A*

Se pipetează 3,0 ml din soluția etalon de lucru nediluată de vitamină A, preparată conform punctului 5.6.1, într-un balon gradat de 50 ml (punctul 4.2.2) și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Se pipetează 5,0 ml din această soluție într-un balon gradat de 25 ml și se completează până la semn cu 2-propanol (punctul 3.8). Concentrația nominală a acestei soluții este de 6,72 UI vitamină A per ml. Se măsoară spectrul UV al acestei soluții comparativ cu cel al soluției de 2-propanol (punctul 3.8), în spectrofotometru (punctul 4.6), în intervalul 300-400 nm. Maximumul de extincție trebuie să fie între 325 și 327 nm.

Calculul conținutului de vitamină A:

$$UI \text{ vitamină A/ml} = E_{325} 18,30$$

$$\left(E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} \text{ pentru vitamină A alcool} = 18211\right)$$

6. *Calculul rezultatelor*

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de vitamină A ale soluției de eșantion se determină concentrația soluției de eșantion în UI/ml prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.2).

Conținutul w de vitamină A al eșantionului, în UI/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \text{ c } V_2 \text{ 1 000}}{V_1 \text{ m}} [\text{IU/kg}]$$

unde:

7.4. În cazul uleiului din ficat de cod și al altor grăsimi pure, timpul de saponificare se prelungește la 45-60 minute. 7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă. 7.6. Utilizându-se o coloană cu fază normală, separarea izomerilor de retinol este posibilă. Dar în acest caz, înălțimile (ariile) vârfurilor izomerilor all-cis și all-trans trebuie însumate pentru a face calcule. 7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic. 7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA. 7.9. În cazul analizării vitaminei A în înlocuitorii de lapte, se acordă o atenție deosebită la — saponificare (punctul 5.2): din cauza cantității de grăsimi prezente în eșantion, poate fi necesară creșterea cantității de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4); — extracție (punctul 5.3): din cauza prezenței emulsiilor, poate fi necesară adaptarea valorii raportului de 2:1 pentru apă/etanol. Pentru a verifica dacă metoda de analizare aplicată generează rezultate fiabile pentru această matrice specifică (înlocuitor de lapte), se aplică un test de recuperare pe o porție suplimentară de testat. Dacă rata de recuperare este mai mică de 80 %, rezultatul analitic trebuie corectat în funcție de recuperare. 8. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior. 9. Rezultatele unui studiu colaborativ (20)	c=concentrația de vitamină A a soluției de eșantion (punctul 5.4), în UI/ml; V_1 = volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml; V_2 = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml; m = greutatea porțiunii de testat, în g. 7. Observații 7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină A poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC. 7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsimi. 7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia. 7.4. În cazul uleiului din ficat de cod și al altor grăsimi pure, timpul de saponificare se prelungește la 45-60 minute. 7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă. 7.6. Utilizându-se o coloană cu fază normală, separarea izomerilor de retinol este posibilă. Dar în acest caz, înălțimile (ariile) vârfurilor izomerilor all-cis și all-trans trebuie însumate pentru a face calcule. 7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic. 7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA. 7.9. În cazul analizării vitaminei A în înlocuitorii de lapte, se acordă o atenție deosebită la — saponificare (punctul 5.2): din cauza cantității de grăsimi prezente în eșantion, poate fi necesară creșterea cantității de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4);	

Preamestec	Furaje de tip preamestec	Concentrate minerale	Furaje proteice	Hrană pentru porci		— extracție (punctul 5.3): din cauza prezenței emulsiilor, poate fi necesară adaptarea valorii raportului de 2:1 pentru apă/etanol. Pentru a verifica dacă metoda de analizare aplicată generează rezultate fiabile pentru această matrice specifică (înlocuitor de lapte), se aplică un test de recuperare pe o porție suplimentară de testat. Dacă rata de recuperare este mai mică de 80 %, rezultatul analitic trebuie corectat în funcție de recuperare.		
L	13	12	13	12	13			
n	48	45	47	46	49			
medie (UI/kg)	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070			
sr (UI/kg)	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682			
r (UI/kg)	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910			
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8			
sR (UI/kg)	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614			
R (UI/kg)	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119			
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20			
						8. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior.		
						9. Rezultatele unui studiu colaborativ (²⁰)		
Preamestec	Furaje de tip preamestec	Concentrate minerale	Furaje proteice	Hrană pentru porci				
L	13	12	13	12	13			
n	48	45	47	46	49			
medie (UI/kg)	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070			
sr (UI/kg)	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682			
r (UI/kg)	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910			
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8			

L: număr de laboratoare n: număr de valori unice sr: deviația standard a repetabilității sR: deviația standard a reproductibilității r: repetabilitate R: reproductibilitate CVr: coeficientul de variație a repetabilității CVR: coeficientul de variație a reproductibilității	sR (UI/kg)	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
	R (UI/kg)	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
	CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
	L: număr de laboratoare n: număr de valori unice sr: deviația standard a repetabilității sR: deviația standard a reproductibilității r: repetabilitate R: reproductibilitate CVr: coeficientul de variație a repetabilității CVR: coeficientul de variație a reproductibilității					

Cilindru din sticlă (4.8.1) (înălțime aproximativă 48 cm) Pieșă din sticlă gîlețuță (4.8.2) (lungime aproximativă 45 cm) Tub reglabil Strat de ulei de petrol Strat apă + furaj saponificat	Cilindru din sticlă (4.8.1) (înălțime aproximativă 48 cm) Pieșă din sticlă gîlețuță (4.8.2) (lungime aproximativă 45 cm) Tub reglabil Strat de ulei de petrol Strat apă + furaj saponificat		
B. DETERMINAREA VITAMINEI E Vitamina E se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de EN 17547 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea conținutului de vitamine A, E și D (²¹) – Metodă care	B. DETERMINAREA VITAMINEI E Vitamina E se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17547:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză –		

utilizează extracția în fază solidă (SPE) și cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescență, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină E din furaje. Conținutul de vitamină E se exprimă ca mg DL-α-tocoferol acetat per kg 1 mg DL-α-tocoferol acetat corespunde la 0,91 mg DL-α-tocoferol (vitamină E). Limita de cuantificare este 2 mg de vitamină E/kg Această limită de cuantificare se obține doar cu detectorul de fluorescență. Cu un detector de UV, limita de cuantificare este 10 mg/kg 2. Principiu Eșantionul se hidrolizează cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu, iar vitamina E se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol și, dacă este necesar, se diluează până la concentrația necesară. Conținutul de vitamina E se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de fluorescență sau de UV. 3. Reactivi 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$ 3.2. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C 3.3. Metanol 3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, $c = 50 \text{ g/100 ml}$ 3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (a se vedea observațiile de la punctul 7.7) 3.6. Sulfură de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$) 3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ în glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8)	Determinarea conținutului de vitamine A, E și D (²¹) – Metodă care utilizează extracția în fază solidă (SPE) și cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (RP-HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV sau un detector de fluorescență, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Această metodă permite determinarea nivelului de vitamină E din furaje. Conținutul de vitamină E se exprimă ca mg DL-α-tocoferol acetat per kg 1 mg DL-α-tocoferol acetat corespunde la 0,91 mg DL-α-tocoferol (vitamină E). Limita de cuantificare este 2 mg de vitamină E/kg Această limită de cuantificare se obține doar cu detectorul de fluorescență. Cu un detector de UV, limita de cuantificare este 10 mg/kg 2. Principiu Eșantionul se hidrolizează cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu, iar vitamina E se extrage cu eter de petrol. Solventul se îndepărtează prin evaporare, iar reziduul se dizolvă în metanol și, dacă este necesar, se diluează până la concentrația necesară. Conținutul de vitamina E se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de fluorescență sau de UV. 3. Reactivi 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$ 3.2. Eter de petrol, interval de fierbere 40-60 °C 3.3. Metanol 3.4. Soluție de hidroxid de potasiu, $c = 50 \text{ g/100 ml}$ 3.5. Soluție de ascorbat de sodiu, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (a se vedea observațiile de la punctul 7.7) 3.6. Sulfură de sodiu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)	

3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1) 3.8. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite. 3.9. Azot, lipsit de oxigen 3.10. DL-α-tocoferol acetat, extra pur, cu activitate certificată 3.10.1. Soluție stoc de DL-α-tocoferol acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL-α-tocoferol acetat (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL-α-tocoferol acetat. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.1.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4). 3.11. DL-α-tocoferol, extra pur, cu activitate certificată 3.11.1. Soluție stoc de DL-α-tocoferol: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL-α-tocoferol (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL-α-tocoferol. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.2.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4). 3.12. 2,6-di-<i>terț</i>-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5) 4. Aparatură 4.1. Evaporator rotativ cu generare de film. 4.2. Sticlărie laborator brună 4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită; 4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml; 4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită; 4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită.	3.6.1. Soluție de sulfură de sodiu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ în glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pentru $x = 9$) (a se vedea observațiile de la punctul 7.8) 3.7. Soluție de fenolftaleină, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ în etanol (punctul 3.1) 3.8. Fază mobilă pentru HPLC: amestec de metanol (punctul 3.3) și apă, de exemplu $980 + 20 \text{ (v + v)}$. Proporția exactă este determinată de caracteristicile coloanei folosite. 3.9. Azot, lipsit de oxigen 3.10. DL-α-tocoferol acetat, extra pur, cu activitate certificată 3.10.1. Soluție stoc de DL-α-tocoferol acetat: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL-α-tocoferol acetat (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL-α-tocoferol acetat. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.1.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4). 3.11. DL-α-tocoferol, extra pur, cu activitate certificată 3.11.1. Soluție stoc de DL-α-tocoferol: Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 100 mg de DL-α-tocoferol (punctul 3.11) într-un balon gradat de 100 ml. Se dizolvă în etanol (punctul 3.1) și se completează până la semn cu același solvent. 1 ml din această soluție conține 1 mg de DL-α-tocoferol. (pentru control UV a se vedea punctul 5.6.2.3; pentru stabilizare a se vedea observațiile de la punctul 7.4). 3.12. 2,6-di-<i>terț</i>-butil-4-metilfenol (BHT) (a se vedea observațiile de la punctul 7.5) 4. Aparatură 4.1. Evaporator rotativ cu generare de film. 4.2. Sticlărie laborator brună 4.2.1. Baloane cu fund plat sau flacoane tip Erlenmeyer, 500 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită;		

4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz. 4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2). 4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție 4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent; 4.5.2. Detector de fluorescență sau de UV, cu ajustare variabilă a lungimii de undă. 4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm. 4.7. Baie de apă cu agitator magnetic. 4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din: 4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite; 4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare. 5. Procedura <i>Notă:</i> Vitamina E este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul). 5.1. Pregătirea eșantionului Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina E. 5.2. Saponificarea	4.2.2. Baloane gradate cu dopuri de sticlă șlefuită, cu gât îngust, de 10, 25, 100 și 500 ml; 4.2.3. Pâlnii de separare, conice, 1 000 ml, cu dopuri de sticlă șlefuită; 4.2.4. Flacoane piriforme, 250 ml, cu orificiu din sticlă șlefuită. 4.3. Condensator Allihn, cu lungime a mantalei de 300 mm, cu îmbinare de sticlă șlefuită și cu adaptor pentru conductă de alimentare cu gaz. 4.4. Filtru de hârtie plisată pentru separarea fazelor, cu diametru de 185 mm (de exemplu Schleicher & Schuell 597 HY 1/2). 4.5. Echipament HPLC cu sistem de injecție 4.5.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 250 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 5 sau 10 μm, sau echivalent; 4.5.2. Detector de fluorescență sau de UV, cu ajustare variabilă a lungimii de undă. 4.6. Spectrofotometru cu celule de cuarț de 10 mm. 4.7. Baie de apă cu agitator magnetic. 4.8. Aparat de extracție (a se vedea figura 1) compus din: 4.8.1. Cilindru din sticlă cu capacitate de 1 l prevăzut cu gât și dop de sticlă șlefuite; 4.8.2. Piesă din sticlă șlefuită echipată cu o tijă laterală și un tub reglabil care trece prin centru. Tubul ajustabil are un capăt inferior în formă de „U” și o duză la capătul opus, astfel încât stratul superior de lichid din cilindru să poată fi transferat într-o pâlnie de separare. 5. Procedura <i>Notă:</i> Vitamina E este sensibilă la lumină (UV) și la oxidare. Toate operațiunile se efectuează în absența luminii (în recipiente de sticlă brună sau protejate cu folie de aluminiu) și în absența oxigenului (se expune unui flux de azot). În timpul extracției, aerul de deasupra lichidului se înlocuiește		

În funcție de greutatea conținutului de vitamina E, se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, 2-25 g de eșantion într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1). Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.12), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la vas și se introduce vasul într-o baie de apă cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei. 5.3. Extracție Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție (punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute. 5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3) Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2). Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu	cu azot (a se evita excesul de presiune slăbind din când în când dopul). 5.1. Pregătirea eșantionului Se macină eșantionul pentru a trece printr-o sită cu ochiuri de 1 mm, evitându-se producerea de căldură. Măcinarea trebuie efectuată imediat înainte de cântărire și saponificare, în caz contrar riscându-se pierderi de vitamina E. 5.2. Saponificarea În funcție de greutatea conținutului de vitamina E, se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, 2-25 g de eșantion într-un balon cu fund plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1). Se adaugă, agitând circular, 130 ml de etanol (punctul 3.1), aproximativ 100 mg de BHT (punctul 3.12), 2 ml de soluție de ascorbat de sodiu (punctul 3.5) și 2 ml de soluție de sulfură de sodiu (punctul 3.6). Se montează un condensator (punctul 4.3) la vas și se introduce vasul într-o baie de apă cu agitator magnetic (punctul 4.7). Se încălzește până la fierbere și se lasă să reflueze timp de 5 minute. Apoi se adaugă 25 ml de soluție de hidroxid de potasiu (punctul 3.4) prin condensator (punctul 4.3) și se lasă să reflueze timp de încă 25 min, amestecând sub un flux ușor de azot. Apoi se clătește condensatorul cu circa 20 ml de apă și se răcește conținutul vasului la temperatura camerei. 5.3. Extracție Se transferă cantitativ prin decantare soluția saponificată, prin clătire cu un volum total de 250 ml de apă într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3) sau în aparatul de extracție (punctul 4.8). Se clătește succesiv vasul de saponificare cu 25 ml de etanol (punctul 3.1) și 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) și se transferă lichidul de clătire în pâlnia de separare sau în aparatul de extracție. Proporția de apă și etanol în soluțiile combinate trebuie să fie de cca 2:1. Se agită energic timp de 2 minute și se lasă să se sedimenteze timp de 2 minute.	

cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat.

5.4. Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC

Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o

5.3.1. Extracția folosind o pâlnie de separare (punctul 4.2.3)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se transferă stratul de eter de petrol într-o altă pâlnie de separare (punctul 4.2.3). Se repetă această extracție de două ori cu 100 ml eter de petrol (punctul 3.2) și de două ori cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2).

Se spală de două ori extractele combinate în pâlnia de separare amestecând ușor (pentru a se evita formarea de emulsii) cu cantități de 100 ml de apă și din nou, prin agitare repetată cu alte cantități de apă de 100 ml până când apa rămâne incoloră după adăugarea unei soluții de fenolftaleină (punctul 3.7) (patru spălări sunt în general suficiente). Se filtrează extractul spălat cu un filtru cutat uscat pentru separarea fazelor (punctul 4.4) pentru a se elimina apa în suspensie și se transferă într-un balon gradat de 500 ml (punctul 4.2.2). Se clătesc pâlnia de separare și filtrul cu 50 ml eter de petrol (punctul 3.2), se completează până la semn cu eter de petrol (punctul 3.2) și se amestecă bine.

5.3.2. Extracția folosind un aparat de extracție (punctul 4.8)

Când straturile s-au separat (a se vedea observația de la punctul 7.3), se înlocuiește dopul cilindrului de sticlă (punctul 4.8.1) prin inserție de sticlă șlefuită (punctul 4.8.2) și se amplasează extremitatea inferioară în formă de „U” a tubului reglabil astfel încât să se afle exact deasupra nivelului interfeței. Aplicând o presiune de la generatorul de azot prin brațul lateral, se transferă stratul superior de eter de petrol într-o pâlnie de separare de 1 000 ml (punctul 4.2.3). Se adaugă 100 ml de eter de petrol (punctul 3.2) în cilindrul de sticlă, se pune dopul și se agită energic. Se lasă straturile să se separe și se transferă stratul superior în pâlnia de separare, la fel ca înainte. Se repetă procedura de extracție cu încă 100 ml eter de petrol (punctul 3.2), apoi de două ori cu cantități

temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.9) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă imediat reziduul într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de DL- α -tocoferol trebuie să fie în intervalul 5-30 μ g/ml).

5.5. Determinarea prin HPLC

Vitamina E se separă pe o coloană cu fază inversată C₁₈ (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de fluorescență (excitație: 295 nm, emisie: 330 nm) sau un detector UV (292 nm) (punctul 4.5.2).

Se injectează o porție alicotă (de exemplu, 20 μ l) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.8). Se calculează înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale aceleiași soluții eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2).

Condiții HPLC

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm $\times$ 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μ m sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.8):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu, 980 + 20 (v + v).
Debit:	1-2 ml/min

de 50 ml eter de petrol (punctul 3.2) și se adaugă straturile de eter de petrol în pâlnia de separare.

Se spală extractele combinate de eter de petrol conform procedurii descrise la punctul 5.3.1 și se procedează conform punctului menționat.

5.4. Prepararea soluției de eșantion pentru HPLC

Se pipetează o parte alicotă din soluția de eter de petrol (de la punctul 5.3.1 sau 5.3.2) într-un balon piriform de 250 ml (punctul 4.2.4). Se evaporă solventul aproape în totalitate pe evaporatorul rotativ (punctul 4.1), cu presiune redusă, la o temperatură a băii de apă de maximum 40 °C. Se restabilește presiunea atmosferică prin admisia azotului (punctul 3.9) și se îndepărtează flaconul din evaporatorul rotativ. Se elimină restul de solvent cu un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă imediat reziduul într-un volum cunoscut (10-100 ml) de metanol (punctul 3.3) (concentrația de DL- α -tocoferol trebuie să fie în intervalul 5-30 μ g/ml).

5.5. Determinarea prin HPLC

Vitamina E se separă pe o coloană cu fază inversată C₁₈ (punctul 4.5.1), iar concentrația se măsoară cu un detector de fluorescență (excitație: 295 nm, emisie: 330 nm) sau un detector UV (292 nm) (punctul 4.5.2).

Se injectează o porție alicotă (de exemplu, 20 μ l) din soluția metanolică obținută la punctul 5.4 și se eluează cu faza mobilă (punctul 3.8). Se calculează înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale aceleiași soluții eșantion și înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru mai multe injectări ale soluțiilor de calibrare (punctul 5.6.2).

Condiții HPLC

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Detector (punctul 4.5.2)	Detector de fluorescență (excitație: 295 nm/ emisie: 330 nm) sau detector UV (292 nm)	Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , particule de 5 sau 10 μm sau echivalent		
5.6. Calibrare (DL-α-tocoferol acetat sau DL-α-tocoferol)		Faza mobilă (punctul 3.8):	Amestec de metanol (punctul 3.3) și apă de exemplu, 980 + 20 (v + v).		
5.6.1. Etalon de DL-α-tocoferol acetat		Debit:	1-2 ml/min		
5.6.1.1. Prepararea soluției etalon de lucru		Detector (punctul 4.5.2)	Detector de fluorescență (excitație: 295 nm/ emisie: 330 nm) sau detector UV (292 nm)		
Se picură din pipetă 25 ml din soluția stoc de DL--tocoferolα-tocoferol acetat (punctul 3.10.1) într-un balon cu fundul plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează conform procedurii descrise la punctul 5.2. Se realizează apoi extracția cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol. Se lasă să se evaporeze 25 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă din nou reziduul în 25,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 45,5 μg DL-α-tocoferol per ml, echivalent cu 50 μg DL-α-tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare. 5.6.1.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,5, 5,0, 10,0 și 25,0 μg/ml DL-α-tocoferol acetat, echivalent cu 2,28, 4,55, 9,10 μg/ml și 22,8 μg/ml DL-α-tocoferol. Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.		5.6. Calibrare (DL-α-tocoferol acetat sau DL-α-tocoferol) 5.6.1. Etalon de DL-α-tocoferol acetat 5.6.1.1. Prepararea soluției etalon de lucru Se picură din pipetă 25 ml din soluția stoc de DL--tocoferolα-tocoferol acetat (punctul 3.10.1) într-un balon cu fundul plat sau într-un flacon tip Erlenmeyer, de 500 ml (punctul 4.2.1) și se hidrolizează conform procedurii descrise la punctul 5.2. Se realizează apoi extracția cu eter de petrol (punctul 3.2) conform punctului 5.3 și se completează până la 500 ml cu eter de petrol. Se lasă să se evaporeze 25 ml din acest extract aproape în totalitate în evaporatorul rotativ (a se vedea punctul 5.4), se îndepărtează solventul rămas într-un curent de azot (punctul 3.9) și se dizolvă din nou reziduul în 25,0 ml de metanol (punctul 3.3). Concentrația nominală a acestei soluții este de 45,5 μg DL-α-tocoferol per ml, echivalent cu 50 μg DL-α-tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.			

5.6.1.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1)

Se diluează 5,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6), între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă este de 284 nm:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6$ la 284 nm în etanol

La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție între 0,84 și 0,88.

5.6.2. Etalonul de DL- α -tocoferol

5.6.2.1. Prepararea soluției etalon de lucru

Se pun cu pipeta 2 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml, se dizolvă în metanol (punctul 3.3) și se completează până la semn cu metanol. Concentrația nominală a acestei soluții este de 40 μg DL- α -tocoferol per ml, echivalent cu 44,0 μg DL- α -tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.2.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,0, 4,0, 8,0 și 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol, echivalent cu 2,20, 4,40, 8,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ și 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol acetat.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.1.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,5, 5,0, 10,0 și 25,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol acetat, echivalent cu 2,28, 4,55, 9,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ și 22,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tocoferol.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.1.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1)

Se diluează 5,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol acetat (punctul 3.10.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6), între 250 nm și 320 nm.

Absorbția maximă este de 284 nm:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6$ la 284 nm în etanol

La această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție între 0,84 și 0,88.

5.6.2. Etalonul de DL- α -tocoferol

5.6.2.1. Prepararea soluției etalon de lucru

Se pun cu pipeta 2 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) într-un balon gradat de 50 ml, se dizolvă în metanol (punctul 3.3) și se completează până la semn cu metanol. Concentrația nominală a acestei soluții este de 40 μg DL- α -tocoferol per ml, echivalent cu 44,0 μg DL- α -tocoferol acetat per ml. Soluția etalon de lucru trebuie să fie preparată imediat înainte de utilizare.

5.6.2.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1)

Se diluează 2,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6) între 250 nm și 320 nm. Absorbția maximă este de 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ la } 292 \text{ nm în etanol}$$

La această

diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție de 0,6.

6. Calculul rezultatelor

Pornindu-se de la înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de vitamina E ale soluției de eșantion, se determină concentrația soluției de eșantion în $\mu\text{g/ml}$ (calculată ca DL- α -tocoferol acetat) prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.1.2 sau 5.6.2.2).

Conținutul w de vitamina E al eșantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{500 \cdot c \cdot V_2}{V_1 \cdot m} [\text{mg/kg}]$$

unde:

c=concentrația de vitamina E (ca DL- α -tocoferol acetat) al soluției de eșantion (punctul 5.4) în $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml

V_2 = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. Observații

7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină E poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC.

7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsime.

5.6.2.2. Prepararea soluțiilor de calibrare și a curbei de calibrare

Se transferă 1,0, 2,0, 4,0 și 10,0 ml din soluția etalon de lucru într-o serie de baloane gradate de 20 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.3) și se amestecă. Concentrațiile nominale ale acestor soluții sunt 2,0, 4,0, 8,0 și 20,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tocoferol, echivalent cu 2,20, 4,40, 8,79 $\mu\text{g/ml}$ și 22,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tocoferol acetat.

Se injectează de mai multe ori câte 20 μl din fiecare soluție de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor. În funcție de înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor, se trasează o curbă de calibrare.

5.6.2.3. Standardizarea UV a soluției stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1)

Se diluează 2,0 ml din soluția stoc de DL- α -tocoferol (punctul 3.11.1) în 25,0 ml de etanol și se măsoară spectrul UV al acestei soluții față de etanol (punctul 3.1) în spectrofotometru (punctul 4.6) între 250 nm și 320 nm. Absorbția maximă este de 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ la } 292 \text{ nm în etanol}$$

La

această diluție trebuie să se obțină o valoare de extincție de 0,6.

6. Calculul rezultatelor

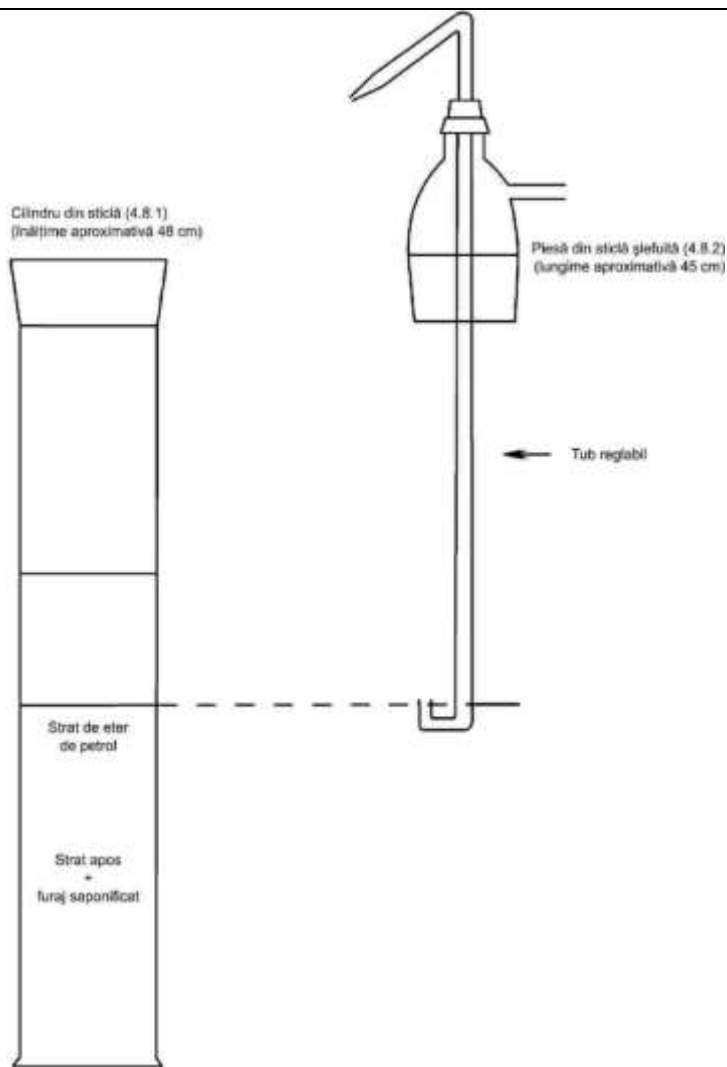
Pornindu-se de la înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de vitamina E ale soluției de eșantion, se determină concentrația soluției de eșantion în $\mu\text{g/ml}$ (calculată ca DL- α -tocoferol acetat) prin referire la curba de calibrare (punctul 5.6.1.2 sau 5.6.2.2).

Conținutul w de vitamina E al eșantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă:

7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia. 7.4. Odată efectuată măsurătoarea spectrofotometrică a soluției de DL-α-tocoferol acetat sau de DL-α-tocoferol, conform punctului 5.6.1.3 sau 5.6.2.3, se adaugă cca 10 mg de BHT (punctul 3.12) la soluție (punctul 3.10.1 sau 3.10.2) și se conservă soluția la frigider (durata maximă de stocare patru săptămâni). 7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă. 7.6. Utilizându-se o coloană în fază normală este posibilă separarea tocoferolilor α, β, γ și δ. 7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic. 7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA. 7.9. Acetatul de vitamina E hidrolizează foarte rapid în condiții alcaline fiind, prin urmare, foarte sensibil la oxidare, mai ales în prezența oligoelementelor, cum ar fi fierul sau cuprul. Determinarea vitaminei E în preamestecuri la niveluri de peste 5 000 mg/kg ar avea drept consecință o degradare a vitaminei E. Prin urmare, pentru confirmare se recomandă o metodă HPLC care include o digestie enzimatică a preparatului de vitamina E fără o etapă de saponificare alcalină 8. Repetabilitate. Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior. 9. Rezultatele unui studiu colaborativ (22)	$w = \frac{500 \ c \ V_2}{V_1 \ m} \text{ [mg/kg]}$ unde: c=concentrația de vitamina E (ca DL-α-tocoferol acetat) al soluției de eșantion (punctul 5.4) în $\mu\text{g/ml}$ V_1 = volumul soluției de eșantion (punctul 5.4), în ml V_2 = volumul de alicotă prelevat la punctul 5.4, în ml m = greutatea porțiunii de testat, în g 7. Observații 7.1. Pentru eșantioanele cu concentrații mici de vitamină E poate fi utilă combinarea extractelor cu eter de petrol provenite din două operații de saponificare (cantitate cântărită: 25 g) într-o soluție de eșantion pentru determinare prin HPLC. 7.2. Eșantionul prelevat pentru analiză nu conține mai mult de 2 g de grăsimi. 7.3. Dacă nu are loc separația fazelor, se adaugă cca 10 ml de etanol (punctul 3.1) pentru a fragmenta emulsia. 7.4. Odată efectuată măsurătoarea spectrofotometrică a soluției de DL-α-tocoferol acetat sau de DL-α-tocoferol, conform punctului 5.6.1.3 sau 5.6.2.3, se adaugă cca 10 mg de BHT (punctul 3.12) la soluție (punctul 3.10.1 sau 3.10.2) și se conservă soluția la frigider (durata maximă de stocare patru săptămâni). 7.5. BHT poate fi înlocuit cu hidrochinonă. 7.6. Utilizându-se o coloană în fază normală este posibilă separarea tocoferolilor α, β, γ și δ. 7.7. Soluția de ascorbat de sodiu poate fi înlocuită cu cca 150 mg de acid ascorbic. 7.8. Soluția de sulfură de sodiu poate fi înlocuită cu cca 50 mg de EDTA.	

	Preamestec	Furaje de tip preamestec	Concentra te minerale	Furaje proteice	Hrană pentru porci	7.9. Acetatul de vitamina E hidrolizează foarte rapid în condiții alcaline fiind, prin urmare, foarte sensibil la oxidare, mai ales în prezența oligoelementelor, cum ar fi fierul sau cuprul. Determinarea vitaminei E în preamestecuri la niveluri de peste 5 000 mg/kg ar avea drept consecință o degradare a vitaminei E. Prin urmare, pentru confirmare se recomandă o metodă HPLC care include o digestie enzimatică a preparatului de vitamina E fără o etapă de saponificare alcalină 8. Repetabilitate. Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele realizate pe același eșantion nu trebuie să depășească 15 % din rezultatul superior. 9. Rezultatele unui studiu colaborativ (22)		
L	12	12	12	12	12			
n	48	48	48	48	48			
medie (mg/kg)	17 380	1 187	926	315	61,3			
sr (mg/kg)	384	45,3	25,2	13,0	2,3			
r (mg/kg)	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4			
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8			
sR (mg/kg)	830	65,0	55,5	18,9	7,8			
R (mg/kg)	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8			
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7			

L: număr de laboratoare n: număr de valori unice s _r : deviația standard a repetabilității s _R : deviația standard a reproductibilității r: repetabilitate R: reproductibilitate CV _r : coeficientul de variație a repetabilității CV _R : coeficientul de variație a reproductibilității		Preamestec	Furaje de tip pământ	Concentrație minerale	Furaje proteice	Hrană pentru porci		
	L	12	12	12	12	12		
	n	48	48	48	48	48		
	medie (mg/kg)	17 380	1 187	926	315	61,3		
	s _r (mg/kg)	384	45,3	25,2	13,0	2,3		
Figura 2 Aparat de extracție (punctul 4.8)	r (mg/kg)	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4		
	CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8		
	s _R (mg/kg)	830	65,0	55,5	18,9	7,8		
	R (mg/kg)	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8		
	CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7		



C. DETERMINAREA OLIGOELEMENTELOR FIER, CUPRU, MANGAN ȘI ZINC

Conținutul de fier, cupru, mangan și zinc se determină prin:

L : număr de laboratoare

n : număr de valori unice

s_r : deviația standard a repetabilității

SR : deviația standard a reproductibilității

r : repetabilitate

R : reproductibilitate

CV_r : coeficientul de variație a repetabilității

CV_R : coeficientul de variație a reproductibilității

Figura 2

Aparat de extracție (punctul 4.8)

Metoda de analiză prevăzută de EN 15510 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului şi plumbului prin ICP-AES; sau

Metoda de analiză prevăzută de EN 15621 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului şi cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau

Metoda de analiză prevăzută de EN 17053 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele şi a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă); sau

Metoda de analiză prevăzută de EN ISO 6869 Hrană pentru animale: Determinarea conţinutului de calciu, cupru, fier, magneziu, mangan, potasiu, sodiu şi zinc. Metoda care utilizează spectrometria de absorbţie atomică; sau

Metoda spectrometriei de absorbţie atomică cu flacără (FAAS), descrisă la punctele 1-8 de mai jos.

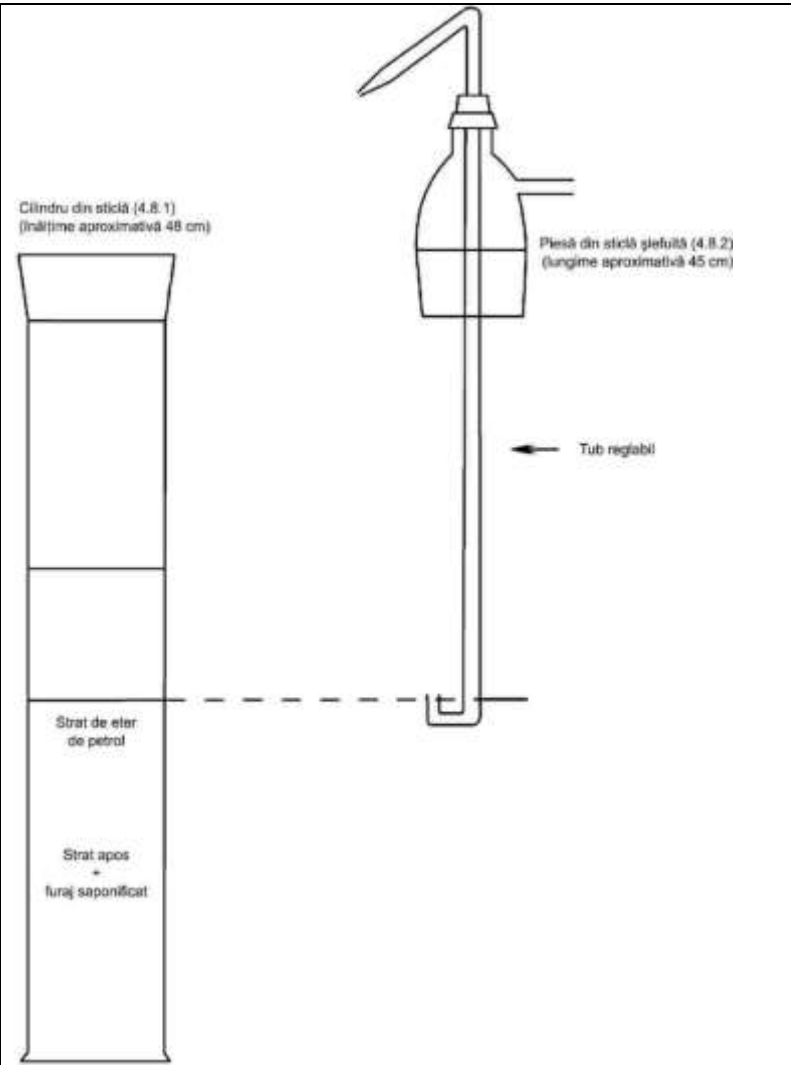
1. Obiectiv şi domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea oligoelementelor fier, cupru, mangan şi zinc din furaje (23). Limitele de cuantificare sunt:

fier (Fe): 20 mg/kg

cupru (Cu): 10 mg/kg

mangan (Mn): 20 mg/kg



C. DETERMINAREA OLIGOELEMENTELOR FIER, CUPRU, MANGAN ŞI ZINC

Conţinutul de fier, cupru, mangan şi zinc se determină prin:
— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză –

zinc (Zn): 20 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul este pus în soluție de acid clorhidric după distrugerea materiei organice, dacă aceasta este prezentă. Se determină elementele fier, cupru, mangan și zinc, după o diluare corespunzătoare, cu ajutorul spectrometriei de absorbție atomică.

3. Reactivi

Comentarii introductive

Pentru prepararea reactivilor și a soluțiilor analitice se folosește apă fără cationii care urmează să fie determinați, obținută fie prin distilarea dublă a apei într-un distilator din sticlă borosilicat sau din cuarț, fie prin dublu tratament cu rășină schimbătoare de ioni.

Reactivii trebuie să fie cel puțin de calitate analitică. Absența elementului care urmează să fie determinat trebuie verificată într-un experiment martor. Dacă este necesar, reactivii trebuie să fie purificați în continuare.

În locul soluțiilor etalon descrise mai jos pot fi folosite soluții etalon din comerț, cu condiția ca ele să fie garantate și să fi fost verificate înainte de utilizare.

3.1. Acid clorhidric. (d:1,19 g/ml).

3.2. Acid clorhidric. (6 mol/litru).

3.3. Acid clorhidric. (0,5 mol/litru).

3.4. Acid fluorhidric 38-40 % (v/v) cu un conținut de fier (Fe) de mai puțin de 1 mg/litru și un reziduu după evaporare de mai puțin de 10 mg (ca sulfat)/litru.

3.5. Acid sulfuric. (d: 1,84 g/ml).

3.6. Peroxid de hidrogen. [circa 100 volume de oxigen (punctul 30 % în greutate)].

3.7. Soluție etalon de fier (1 000 μg Fe/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: se dizolvă 1 g de sârmă de fier în 200 ml de acid clorhidric

Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului și plumbului prin ICP-AES; sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 15621:2018

Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză –

Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului,

potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului

și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES; sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17053:2018

Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză –

Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor

elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă); sau

— Metoda de analiză prevăzută de SM SR EN ISO

6869:2012 Hrană pentru animale: Determinarea conținutului

de calciu, cupru, fier, magneziu, mangan, potasiu, sodiu și

zinc. Metoda care utilizează spectrometria de absorbție

atomică; sau

— Metoda spectrometriei de absorbție atomică cu flacără

(FAAS), descrisă la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea oligoelementelor fier, cupru, mangan și zinc din furaje (²³). Limitele de cuantificare sunt:

— fier (Fe): 20 mg/kg

— cupru (Cu): 10 mg/kg

— mangan (Mn): 20 mg/kg

— zinc (Zn): 20 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul este pus în soluție de acid clorhidric după distrugerea materiei organice, dacă aceasta este prezentă. Se determină elementele fier, cupru, mangan și zinc, după o diluare corespunzătoare, cu ajutorul spectrometriei de

absorbție atomică.

3. Reactivi

Comentarii introductive

6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 16 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă. 3.7.1. Soluție etalon de lucru de fier (100 µg Fe/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.7) cu 9 părți de apă. 3.8. Soluție etalon de cupru (1 000 µg Cu/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: — se dizolvă 1 g de praf de cupru în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă. 3.8.1. Soluție etalon de cupru de lucru (10 µg Cu/ml) preparată diluând o parte din soluția standard (punctul 3.8) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.9. Soluție etalon de mangan (1 000 µg Mn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: — se dizolvă 1 g de praf de mangan în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă. 3.9.1. Soluție etalon de lucru de mangan (10 µg Mn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.9) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.10. Soluție etalon de zinc (1 000 µg Zn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: — se dizolvă 1 g de zinc sub formă de benzi sau folii în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă.	Pentru prepararea reactivilor și a soluțiilor analitice se folosește apă fără cationii care urmează să fie determinați, obținută fie prin distilarea dublă a apei într-un distilator din sticlă borosilicat sau din cuarț, fie prin dublu tratament cu rășină schimbătoare de ioni. Reactivii trebuie să fie cel puțin de calitate analitică. Absența elementului care urmează să fie determinat trebuie verificată într-un experiment martor. Dacă este necesar, reactivii trebuie să fie purificați în continuare. În locul soluțiilor etalon descrise mai jos pot fi folosite soluții etalon din comerț, cu condiția ca ele să fie garantate și să fi fost verificate înainte de utilizare. 3.1. Acid clorhidric. (d:1,19 g/ml). 3.2. Acid clorhidric. (6 mol/litru). 3.3. Acid clorhidric. (0,5 mol/litru). 3.4. Acid fluorhidric 38-40 % (v/v) cu un conținut de fier (Fe) de mai puțin de 1 mg/litru și un reziduu după evaporare de mai puțin de 10 mg (ca sulfat)/litru. 3.5. Acid sulfuric. (d: 1,84 g/ml). 3.6. Peroxid de hidrogen. [circa 100 volume de oxigen (punctul 30 % în greutate)]. 3.7. Soluție etalon de fier (1 000 µg Fe/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: se dizolvă 1 g de sârmă de fier în 200 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 16 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă. 3.7.1. Soluție etalon de lucru de fier (100 µg Fe/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.7) cu 9 părți de apă. 3.8. Soluție etalon de cupru (1 000 µg Cu/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț:		

3.10.1. Soluție etalon de lucru de zinc (10 µg Zn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.10) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.11. Soluție de clorură de lantan: se dizolvă 12 g de oxid de lantan în 150 ml de apă, se adaugă 100 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă. 4. Aparatură 4.1. Cuptor cu muflă cu reglare de temperatură și, preferabil, cu dispozitiv de înregistrare. 4.2. Sticlăria trebuie să fie de tip borosilicat rezistent și se recomandă folosirea aparaturii rezervate exclusiv pentru determinarea oligoelementelor. 4.3. Spectrofotometru de absorbție atomică care îndeplinește cerințele metodei cu privire la sensibilitatea și precizia în intervalul necesar. 5. Procedura ⁽²⁴⁾ 5.1. Eșantioane care conțin materie organică 5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză ⁽²⁵⁾ 5.1.1.1. Se introduc 5-10 g de eșantion cântărit cu o abatere de 0,2 mg într-un creuzet de cuarț sau platină [a se vedea nota (b)], se usucă într-un cuptor la 105 °C și se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă neîncălzit (punctul 4.1). Se închide cuptorul [a se vedea nota (c)] și se mărește treptat temperatura până la 450-475 °C, timp de circa 90 de minute. Se menține temperatura timp de 4-16 ore (de exemplu, peste noapte) pentru a îndepărta materialul carbonic și apoi se deschide cuptorul și se lasă să se răcească [a se vedea nota (d)]. Se umezește cenușa cu apă și se transferă substanța obținută într-un pahar de laborator de 250 ml. Se spală creuzetul cu o cantitate totală de circa 5 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) și se adaugă acesta din urmă încet și cu atenție în paharul de laborator (poate apărea o reacție puternică din cauza formării de CO₂). Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1), picătură cu	— se dizolvă 1 g de praf de cupru în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2), se adaugă 5 ml de peroxid de hidrogen (punctul 3.6) și se completează până la un litru cu apă. 3.8.1. Soluție etalon de cupru de lucru (10 µg Cu/ml) preparată diluând o parte din soluția standard (punctul 3.8) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.9. Soluție etalon de mangan (1 000 µg Mn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: — se dizolvă 1 g de praf de mangan în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă. 3.9.1. Soluție etalon de lucru de mangan (10 µg Mn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.9) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.10. Soluție etalon de zinc (1 000 µg Zn/ml) preparată conform indicațiilor de mai jos sau o soluție echivalentă din comerț: — se dizolvă 1 g de zinc sub formă de benzi sau folii în 25 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă. 3.10.1. Soluție etalon de lucru de zinc (10 µg Zn/ml) preparată diluând o parte din soluția etalon (punctul 3.10) cu 9 părți de apă și apoi diluând o parte din soluția rezultată cu 9 părți de apă. 3.11. Soluție de clorură de lantan: se dizolvă 12 g de oxid de lantan în 150 ml de apă, se adaugă 100 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) și se completează până la un litru cu apă. 4. Aparatură		

picătură, agitându-se, până când efervescenta încetează. Se evaporă până la uscare, agitându-se din când în când cu o baghetă de sticlă. Se adaugă apoi 15 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) la reziduu, apoi circa 120 ml de apă. Se amestecă cu bagheta de sticlă, care se lasă în paharul de laborator, și se acoperă paharul cu o sticlă de ceas. Se aduce încet la fierbere și se menține la punctul de fierbere până când cenușa se dizolvă complet. Se filtrează cu hârtie de filtru lipsită de cenușă și se colectează filtratul într-un balon gradat de 250 ml. Se spală paharul de laborator și se filtrează cu 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru fierbinte (punctul 3.2) și de două ori cu apă fiartă. Se umple balonul gradat cu apă până la semn (concentrația de HCl: circa 0,5 mol/litru). 5.1.1.2. Dacă reziduu din filtru este negru (cărbune), se reintroduce în cuptor și se calcinează din nou la 450-475 °C. Calcinarea, care necesită numai câteva ore (între trei și cinci ore), este completă când cenușa este albă sau aproape albă. Se dizolvă reziduu cu aproximativ 2 ml de acid clorhidric (punctul 3.1), se evaporă până la uscare și se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2). Se încălzește, se filtrează soluția în balonul gradat și se umple cu apă până la semn (concentrația HCl: circa 0,5 mol/litru). <i>Note:</i> (a) Este important ca atunci când se măsoară oligoelementele să se țină cont de riscul de contaminare, în special cu zinc, cupru și fier. Din acest motiv, echipamentul folosit în cursul preparării eșantioanelor trebuie să nu conțină aceste metale. Pentru reducerea riscului general de contaminare, se lucrează într-o atmosferă fără praf, folosind un echipament curățat cu mare atenție și o sticlărie spălată cu grijă. Determinarea zincului este în mod special sensibilă la multe tipuri de	4.1. Cuptor cu muflă cu reglare de temperatură și, preferabil, cu dispozitiv de înregistrare. 4.2. Sticlăria trebuie să fie de tip borosilicat rezistent și se recomandă folosirea aparaturii rezervate exclusiv pentru determinarea oligoelementelor. 4.3. Spectrofotometru de absorbție atomică care îndeplinește cerințele metodei cu privire la sensibilitatea și precizia în intervalul necesar. 5. Procedura (²⁴) 5.1. Eșantioane care conțin materie organică 5.1.1. Arderea și prepararea soluției pentru analiză (²⁵) 5.1.1.1. Se introduc 5-10 g de eșantion cântărit cu o abatere de 0,2 mg într-un creuzet de cuarț sau platină [a se vedea nota (b)], se usucă într-un cuptor la 105 °C și se introduce creuzetul în cuptorul cu muflă neîncălzit (punctul 4.1). Se închide cuptorul [a se vedea nota (c)] și se mărește treptat temperatura până la 450-475 °C, timp de circa 90 de minute. Se menține temperatura timp de 4-16 ore (de exemplu, peste noapte) pentru a îndepărta materialul carbonic și apoi se deschide cuptorul și se lasă să se răcească [a se vedea nota (d)]. Se umezește cenușa cu apă și se transferă substanța obținută într-un pahar de laborator de 250 ml. Se spală creuzetul cu o cantitate totală de circa 5 ml de acid clorhidric (punctul 3.1) și se adaugă acesta din urmă încet și cu atenție în paharul de laborator (poate apărea o reacție puternică din cauza formării de CO₂). Se adaugă acid clorhidric (punctul 3.1), picătură cu picătură, agitându-se, până când efervescenta încetează. Se evaporă până la uscare, agitându-se din când în când cu o baghetă de sticlă. Se adaugă apoi 15 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2) la reziduu, apoi circa 120 ml de apă. Se amestecă cu bagheta de sticlă, care se lasă în paharul de laborator, și se	

contaminare, de exemplu prin intermediul sticlăriei, al reactivilor, al prafului etc. (b) Greutatea eșantionului care urmează să fie calcinat rezultă din cantitatea aproximativă de oligoelemente din furaje în raport cu sensibilitatea spectrofotometrului folosit. Pentru anumite tipuri de furaje, sărace în oligoelemente, poate fi necesar să se înceapă cu un eșantion de 10-20 g și să se completeze soluția finală numai până la 100 ml. (c) Arderea trebuie efectuată într-un cuptor închis fără injectare de aer sau de oxigen. (d) Temperatura indicată de piometru nu trebuie să depășească 475 °C. 5.1.2. Determinarea spectrofotometrică 5.1.2.1. Pregătirea soluțiilor de calibrare Pentru fiecare dintre elementele care urmează să fie determinate se prepară din soluțiile etalon de lucru de la punctele 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 și 3.10.1 o gamă de soluții de calibrare, fiecare soluție de calibrare având o concentrație de HCl de aproximativ 0,5 mol/litru și (în cazul fierului, manganului și zincului) o concentrație de clorură de lantan echivalentă cu 0,1 % La (g/v). Concentrațiile de oligoelemente selectate trebuie să se situeze în intervalul sensibilității spectrofotometrului utilizat. Tabelele prezentate în continuare indică, de exemplu, compozițiile unor seturi tipice de soluții de calibrare; totuși, în funcție de tipul și sensibilitatea spectrofotometrului folosit, poate fi necesar să se selecteze alte concentrații. Fier	acoperă paharul cu o sticlă de ceas. Se aduce încet la fierbere și se menține la punctul de fierbere până când cenușa se dizolvă complet. Se filtrează cu hârtie de filtru lipsită de cenușă și se colectează filtratul într-un balon gradat de 250 ml. Se spală paharul de laborator și se filtrează cu 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru fierbinte (punctul 3.2) și de două ori cu apă fiartă. Se umple balonul gradat cu apă până la semn (concentrația de HCl: circa 0,5 mol/litru). 5.1.1.2. Dacă reziduul din filtru este negru (cărbune), se reintroduce în cuptor și se calcinează din nou la 450-475 °C. Calcinarea, care necesită numai câteva ore (între trei și cinci ore), este completă când cenușa este albă sau aproape albă. Se dizolvă reziduul cu aproximativ 2 ml de acid clorhidric (punctul 3.1), se evaporă până la uscare și se adaugă 5 ml de acid clorhidric 6 mol/litru (punctul 3.2). Se încălzește, se filtrează soluția în balonul gradat și se umple cu apă până la semn (concentrația HCl: circa 0,5 mol/litru). <i>Note:</i> (a) Este important ca atunci când se măsoară oligoelementele să se țină cont de riscul de contaminare, în special cu zinc, cupru și fier. Din acest motiv, echipamentul folosit în cursul preparării eșantioanelor trebuie să nu conțină aceste metale. Pentru reducerea riscului general de contaminare, se lucrează într-o atmosferă fără praf, folosind un echipament curățat cu mare atenție și o sticlărie spălată cu grijă. Determinarea zincului este în mod special sensibilă la multe tipuri de contaminare, de exemplu prin intermediul sticlăriei, al reactivilor, al prafului etc. (b) Greutatea eșantionului care urmează să fie calcinat rezultă din cantitatea aproximativă de oligoelemente din furaje în raport cu sensibilitatea spectrofotometrului folosit. Pentru anumite tipuri de furaje, sărace în oligoelemente, poate fi necesar să se înceapă cu un eșantion de 10-20 g și să se completeze soluția finală numai până la 100 ml.	

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.7.1) ($1 \text{ ml} = 100 \mu\text{g Fe}$)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

Cupru

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punctul 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.9.1) ($1 \text{ ml} = 10 \mu\text{g Mn}$)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

Zinc

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8

(c) Arderea trebuie efectuată într-un cuptor închis fără injectare de aer sau de oxigen.

(d) Temperatura indicată de piometru nu trebuie să depășească 475 °C.

5.1.2. Determinarea spectrofotometrică

5.1.2.1. Pregătirea soluțiilor de calibrare

Pentru fiecare dintre elementele care urmează să fie determinate se prepară din soluțiile etalon de lucru de la punctele 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 și 3.10.1 o gamă de soluții de calibrare, fiecare soluție de calibrare având o concentrație de HCl de aproximativ 0,5 mol/litru și (în cazul fierului, manganului și zincului) o concentrație de clorură de lantan echivalentă cu 0,1 % La (g/v).

Concentrațiile de oligoelemente selectate trebuie să se situeze în intervalul sensibilității spectrofotometrului utilizat. Tabelele prezentate în continuare indică, de exemplu, compozițiile unor seturi tipice de soluții de calibrare; totuși, în funcție de tipul și sensibilitatea spectrofotometrului folosit, poate fi necesar să se selecteze alte concentrații.

Fier

$\mu\text{g Fe/ml}$	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.7.1) ($1 \text{ ml} = 100 \mu\text{g Fe}$)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							

Cupru

ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							
5.1.2.2. Prepararea soluției pentru analiză Pentru determinarea cuprului, soluția preparată la punctul 5.1.1 poate fi, în mod normal, folosită direct. Dacă este necesar să se obțină o concentrație situată în intervalul soluțiilor de calibrare, o parte alicotă poate fi pipetată într-un balon gradat de 100 ml și completată până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3). Pentru determinarea fierului, manganului și zincului, se pipetează o parte alicotă din soluția preparată la punctul 5.1.1 într-un balon gradat de 100 ml, se adaugă 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3) (a se vedea și punctul 8, „Observații”). 5.1.2.3. Experiment martor Experimentul martor trebuie să includă toate etapele prevăzute în procedură, cu excepția faptului că materialul de eșantion este omis. Soluția de calibrare „0” nu trebuie să fie folosită ca martor. 5.1.2.4. Măsurarea absorbției atomice							
µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punctul 3.2)	8	8	8	8	8	8	8
Mangan µg Mn/ml							
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă							
Zinc µg Zn/ml							
	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de soluție etalon de lucru (punctul 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8

Se măsoară absorbția atomică a soluțiilor de calibrare și a soluției care urmează să fie analizată folosind o flacără aer-acetilenă oxidantă, la următoarele lungimi de undă: Fe: 248,3 nm Cu: 324,8 nm Mn: 279,5 nm Zn: 213,8 nm Fiecare măsurătoare se realizează de patru ori. 5.2. Furaje minerale Dacă eșantionul nu conține materie organică, calcinarea prealabilă nu este necesară. Se procedează conform descrierii de la punctul 5.1.1.1, începând de la al doilea paragraf. Evaporarea cu acid fluorhidric poate fi omisă. 6. Calculul rezultatelor Folosind o curbă de calibrare, se calculează concentrația de oligoelemente în soluția care urmează să fie analizată și se exprimă rezultatul în mg de oligoelemente per kg de eșantion (ppm). 7. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același laborant nu depășește: — 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de oligoelement în cauză până la 50 mg/kg; — 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 50 până la 100 mg/kg; — 10 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 100 până la 200 mg/kg; — 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză mai mare de 200 mg/kg.	<table><tr><td>ml HCl (punctul 3.2)</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td><td>7</td></tr></table>							ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7		
	ml HCl (punctul 3.2)	7	7	7	7	7	7	7									
+ 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la 100 ml cu apă 5.1.2.2. Prepararea soluției pentru analiză Pentru determinarea cuprului, soluția preparată la punctul 5.1.1 poate fi, în mod normal, folosită direct. Dacă este necesar să se obțină o concentrație situată în intervalul soluțiilor de calibrare, o parte alicotă poate fi pipetată într-un balon gradat de 100 ml și completată până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3). Pentru determinarea fierului, manganului și zincului, se pipetează o parte alicotă din soluția preparată la punctul 5.1.1 într-un balon gradat de 100 ml, se adaugă 10 ml de soluție de clorură de lantan (punctul 3.11) și se completează până la semn cu acid clorhidric 0,5 mol/litru (punctul 3.3) (a se vedea și punctul 8, „Observații”). 5.1.2.3. Experiment martor Experimentul martor trebuie să includă toate etapele prevăzute în procedură, cu excepția faptului că materialul de eșantion este omis. Soluția de calibrare „0” nu trebuie să fie folosită ca martor. 5.1.2.4. Măsurarea absorbției atomice																	

8. Observație Prezența de cantități mari de fosfați ar putea interfera cu determinarea fierului, manganului și zincului. Astfel de interferențe trebuie să fie corectate adăugând soluție de clorură de lantan (punctul 3.11). Dacă, însă, în eșantion, raportul de greutate Ca + Mg/P este > 2, adăugarea soluției de clorură de lantan (punctul 3.11) la soluția de analizat și la soluțiile de calibrare poate fi omisă. D. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HALOFUGINONĂ <i>DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]-chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid</i> Conținutul de halofuginonă se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de halofuginonă din furaje. Limita de cuantificare este de 1 mg/kg 2. Principiu După tratarea cu apă fierbinte, halofuginona se extrage ca bază liberă în acetat de etil și ulterior se separă ca clorhidrat, într-o soluție apoasă de acid. Extractul se purifică prin cromatografie prin schimb ionic. Conținutul de halofuginonă se determină	Se măsoară absorbția atomică a soluțiilor de calibrare și a soluției care urmează să fie analizată folosind o flacără aer-acetilenă oxidantă, la următoarele lungimi de undă: Fe: 248,3 nm Cu: 324,8 nm Mn: 279,5 nm Zn: 213,8 nm Fiecare măsurătoare se realizează de patru ori. 5.2. Furaje minerale Dacă eșantionul nu conține materie organică, calcinarea prealabilă nu este necesară. Se procedează conform descrierii de la punctul 5.1.1.1, începând de la al doilea paragraf. Evaporarea cu acid fluorhidric poate fi omisă. 6. Calculul rezultatelor Folosind o curbă de calibrare, se calculează concentrația de oligoelemente în soluția care urmează să fie analizată și se exprimă rezultatul în mg de oligoelemente per kg de eșantion (ppm). 7. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion de către același laborant nu depășește: — 5 mg/kg, în valoare absolută, pentru conținutul de oligoelement în cauză până la 50 mg/kg; — 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 50 până la 100 mg/kg; — 10 mg/kg, în valoare absolută, pentru un conținut de oligoelement în cauză de la 100 până la 200 mg/kg; — 5 % din valoarea superioară, pentru un conținut de oligoelement în cauză mai mare de 200 mg/kg. 8. Observație Prezența de cantități mari de fosfați ar putea interfera cu determinarea fierului, manganului și zincului. Astfel de interferențe trebuie să fie corectate adăugând soluție de	

prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), prin utilizarea unui detector de raze UV. 3. Reactivi 3.1. Acetonitril, de calitate HPLC 3.2. Rășină Amberlit XAD-2 3.3. Acetat de amoniu 3.4. Acetat de etil 3.5. Acid acetic glacial 3.6. Substanța etalon halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid, E 764) 3.6.1. Soluție etalon stoc de halofuginonă, 100 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de halofuginonă (punctul 3.6) într-un balon gradat de 500 ml, apoi se dizolvă în soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18), se completează până la semn cu soluție tampon și se amestecă. Această soluție este stabilă timp de trei săptămâni, la 5 °C, dacă este depozitată la întuneric. 3.6.2. Soluții de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.6.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.21) și se amestecă. Soluțiile au concentrații de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 µg/ml de halofuginonă. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate. 3.7. Acid clorhidric (ρ₂₀ aproximativ 1,16 g/ml). 3.8. Metanol 3.9. Nitrat de argint 3.10. Ascorbat de sodiu 3.11. Carbonat de sodiu 3.12. Clorură de sodiu 3.13. EDTA (acid etilendiaminotetraacetic, sare disodică) 3.14. Apă, de calitate HPLC 3.15. Soluție de carbonat de sodiu, c = 10 g/100 ml	clorură de lantan (punctul 3.11). Dacă, însă, în eșantion, raportul de greutate Ca + Mg/P este > 2, adăugarea soluției de clorură de lantan (punctul 3.11) la soluția de analizat și la soluțiile de calibrare poate fi omisă. D. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE HALOFUGINONĂ <i>DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetonil]-chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid</i> Conținutul de halofuginonă se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de halofuginonă din furaje. Limita de cuantificare este de 1 mg/kg 2. Principiu După tratarea cu apă fierbinte, halofuginona se extrage ca bază liberă în acetat de etil și ulterior se separă ca clorhidrat, într-o soluție apoasă de acid. Extractul se purifică prin cromatografie prin schimb ionic. Conținutul de halofuginonă se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), prin utilizarea unui detector de raze UV. 3. Reactivi 3.1. Acetonitril, de calitate HPLC 3.2. Rășină Amberlit XAD-2	

3.16. Soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu, c = 5 g/100 ml Se dizolvă 50 g de carbonat de sodiu (punctul 3.11) în apă, se diluează până la 1 litru și se adaugă clorură de sodiu (punctul 3.12) până la saturarea soluției. 3.17. Acid clorhidric, aproximativ 0,1 mol/l Se diluează 10 ml de HCl (punctul 3.7) în apă până la 1 litru. 3.18. Soluție tampon de acetat de amoniu, aproximativ 0,25 mol/l Se dizolvă 19,3 g de acetat de amoniu (punctul 3.3) și 30 ml de acid acetic (punctul 3.5) în apă (punctul 3.14) și se diluează până la 1 litru. 3.19. Prepararea rășinii de Amberlit XAD-2 Se spală cu apă o cantitate corespunzătoare de Amberlit (punctul 3.2), până la îndepărtarea tuturor ionilor de clor, după cum indică testul cu nitrat de argint (punctul 3.20) efectuat pe faza apoasă eliminată. Apoi se spală rășina cu 50 ml de metanol (punctul 3.8), se elimină metanolul și se depozitează rășina în metanol proaspăt. 3.20. Soluție de nitrat de argint, aproximativ 0,1 mol/l Se dizolvă 0,17 g de nitrat de argint (punctul 3.9) în 10 ml de apă. 3.21. Fază mobilă HPLC Se amestecă 500 ml de acetonitril (punctul 3.1) cu 300 ml soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18) și 1 200 ml de apă (punctul 3.14). Se aduce pH-ul la valoarea 4,3 folosind acid acetic (punctul 3.5). Se trece printr-un filtru de 0,22 μm (punctul 4.8) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute). Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este depozitată într-un recipient închis, la întuneric. 4. Aparatură 4.1. Baie cu ultrasunete 4.2. Evaporator rotativ cu generare de film	3.3. Acetat de amoniu 3.4. Acetat de etil 3.5. Acid acetic glacial 3.6. Substanța etalon halofuginonă (DL-trans-7-brom-6-clor-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]chinazolin-4-(3H)-onă hidrobromid, E 764) 3.6.1. Soluție etalon stoc de halofuginonă, 100 μg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de halofuginonă (punctul 3.6) într-un balon gradat de 500 ml, apoi se dizolvă în soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18), se completează până la semn cu soluție tampon și se amestecă. Această soluție este stabilă timp de trei săptămâni, la 5 °C, dacă este depozitată la întuneric. 3.6.2. Soluții de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.6.1) într-o serie de baloane gradate de 100 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.21) și se amestecă. Soluțiile au concentrații de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 și 6,0 μg/ml de halofuginonă. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate. 3.7. Acid clorhidric (p₂₀ aproximativ 1,16 g/ml). 3.8. Metanol 3.9. Nitrat de argint 3.10. Ascorbat de sodiu 3.11. Carbonat de sodiu 3.12. Clorură de sodiu 3.13. EDTA (acid etilendiaminotetraacetic, sare disodică) 3.14. Apă, de calitate HPLC 3.15. Soluție de carbonat de sodiu, c = 10 g/100 ml 3.16. Soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu, c = 5 g/100 ml Se dizolvă 50 g de carbonat de sodiu (punctul 3.11) în apă, se diluează până la 1 litru și se adaugă clorură de sodiu (punctul 3.12) până la saturarea soluției.		

4.3. Centrifugă 4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu grup de diode 4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 300 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 10 μm sau o coloană echivalentă 4.5. Coloană de sticlă (300 mm × 10 mm) prevăzută cu filtru de sticlă sinterizată și cu robinet de închidere 4.6. Filtre din fibră de sticlă, cu diametru de 150 mm 4.7. Filtre cu membrană, 0,45 μm 4.8. Filtre cu membrană, 0,22 μm 5. Procedura <i>Notă</i> Halofuginona ca bază liberă este instabilă în soluții alcaline sau de acetat de etil. Ea nu trebuie să rămână în acetat de etil mai mult de 30 de minute. 5.1. Generalități 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența halofuginonei și a substanțelor interferente. 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de halofuginonă, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 3 mg/kg se adaugă 300 μl din soluția etalon stoc (punctul 3.6.1) la 10 g de furaj martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2). <i>Notă:</i> Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează halofuginonă. 5.2. Extracție Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 g, 10 g de eșantion preparat, într-un tub de centrifugă de 200 ml, se adaugă 0,5 g de ascorbat de sodiu (punctul 3.10), 0,5 g de EDTA (punctul 3.13) și 20 ml de apă, apoi se amestecă. Se plasează tubul într-o baie de apă timp de 5 minute (80 °C). După răcire la temperatura camerei se adaugă 20 ml soluție de carbonat de sodiu (punctul 3.15) și se amestecă. Se adaugă imediat 100 ml de acetat de etil (punctul	3.17. Acid clorhidric, aproximativ 0,1 mol/l Se diluează 10 ml de HCl (punctul 3.7) în apă până la 1 litru. 3.18. Soluție tampon de acetat de amoniu, aproximativ 0,25 mol/l Se dizolvă 19,3 g de acetat de amoniu (punctul 3.3) și 30 ml de acid acetic (punctul 3.5) în apă (punctul 3.14) și se diluează până la 1 litru. 3.19. Prepararea rășinii de Amberlit XAD-2 Se spală cu apă o cantitate corespunzătoare de Amberlit (punctul 3.2), până la îndepărtarea tuturor ionilor de clor, după cum indică testul cu nitrat de argint (punctul 3.20) efectuat pe faza apoasă eliminată. Apoi se spală rășina cu 50 ml de metanol (punctul 3.8), se elimină metanolul și se depozitează rășina în metanol proaspăt. 3.20. Soluție de nitrat de argint, aproximativ 0,1 mol/l Se dizolvă 0,17 g de nitrat de argint (punctul 3.9) în 10 ml de apă. 3.21. Fază mobilă HPLC Se amestecă 500 ml de acetonitril (punctul 3.1) cu 300 ml soluție tampon de acetat de amoniu (punctul 3.18) și 1 200 ml de apă (punctul 3.14). Se aduce pH-ul la valoarea 4,3 folosind acid acetic (punctul 3.5). Se trece printr-un filtru de 0,22 μm (punctul 4.8) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute). Această soluție este stabilă timp de o lună dacă este depozitată într-un recipient închis, la întuneric. 4. Aparatură 4.1. Baie cu ultrasunete 4.2. Evaporator rotativ cu generare de film 4.3. Centrifugă 4.4. Echipament HPLC cu detector de raze UV cu lungimi de undă variabile sau detector cu grup de diode 4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 300 mm × 4 mm, C₁₈, particule de 10 μm sau o coloană echivalentă	

3.4) și se agită energic cu mâna timp de 15 secunde. Apoi tubul se așază într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) timp de 3 minute și se slăbește dopul. Se centrifughează timp de 2 minute și se decantează faza de acetat de etil printr-un filtru de fibră de sticlă (punctul 4.6), într-o pâlnie de separare de 500 ml. Se repetă extracția eșantionului cu o a doua cantitate de 100 ml acetat de etil. Se spală extractele combinate timp de un minut cu 50 ml de soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu (punctul 3.16) și se îndepărtează stratul apos. Se extrage stratul organic timp de 1 minut cu 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.17). Se trece stratul inferior de acid printr-o pâlnie de separare de 250 ml. Se extrage din nou stratul organic timp de 1,5 minute, cu o altă cantitate de 50 ml acid clorhidric, apoi se combină cu primul extract. Se spală extractele de acid combinate prin agitare circulară timp de aproximativ 10 secunde cu 10 ml de acetat de etil (punctul 3.4). Se transferă cantitativ stratul apos într-un balon cu fund rotund de 250 ml și se îndepărtează faza organică. Se evaporă din soluția acidă tot acetatul de etil rămas utilizând un evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.2). Temperatura băii de apă nu trebuie să depășească 40 °C. Sub vid la o presiune de aproximativ 25 mbar întreaga cantitate de acetat de etil rezidual se îndepărtează în 5 minute la 38 °C. 5.3. Curățare 5.3.1. Pregătirea coloanei de Amberlit Pentru fiecare extract de eșantion se pregătește câte o coloană XAD-2. Se transferă 10 g de Amberlit preparat (punctul 3.19) într-o coloană de sticlă (punctul 4.5) cu metanol (punctul 3.8). Se adaugă un dop mic de vată de sticlă deasupra patului de rășină. Se scurge metanolul din coloană și se spală rășina cu 100 ml de apă, oprind fluxul pe măsură ce lichidul ajunge la partea superioară a patului de rășină. Se lasă coloana să se echilibreze timp de 10 minute înainte de utilizare. Niciodată nu se lasă coloana să se usuce.	4.5. Coloană de sticlă (300 mm × 10 mm) prevăzută cu filtru de sticlă sinterizată și cu robinet de închidere 4.6. Filtre din fibră de sticlă, cu diametru de 150 mm 4.7. Filtre cu membrană, 0,45 μm 4.8. Filtre cu membrană, 0,22 μm 5. Procedura <i>Notă</i> Halofuginona ca bază liberă este instabilă în soluții alcaline sau de acetat de etil. Ea nu trebuie să rămână în acetat de etil mai mult de 30 de minute. 5.1. Generalități 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența halofuginonei și a substanțelor interferente. 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de halofuginonă, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 3 mg/kg se adaugă 300 μl din soluția etalon stoc (punctul 3.6.1) la 10 g de furaj martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2). <i>Notă:</i> Conform acestei metode, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează halofuginonă. 5.2. Extracție Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 g, 10 g de eșantion preparat, într-un tub de centrifugă de 200 ml, se adaugă 0,5 g de ascorbat de sodiu (punctul 3.10), 0,5 g de EDTA (punctul 3.13) și 20 ml de apă, apoi se amestecă. Se plasează tubul într-o baie de apă timp de 5 minute (80 °C). După răcire la temperatura camerei se adaugă 20 ml soluție de carbonat de sodiu (punctul 3.15) și se amestecă. Se adaugă imediat 100 ml de acetat de etil (punctul 3.4) și se agită energic cu mâna timp de 15 secunde. Apoi tubul se așază într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) timp de 3 minute și se slăbește dopul. Se centrifughează timp de 2 minute și se decantează	

5.3.2. Curățarea eșantionului Se transferă cantitativ extractul (punctul 5.2) în partea superioară a coloanei de Amberlit preparată (punctul 5.3.1) și se eluează, îndepărtând apoi eluatul. Rata de eluare nu trebuie să depășească 20 ml/min. Se clătește balonul cu fund rotund cu 20 ml de acid clorhidric (punctul 3.17), apoi acesta se folosește pentru spălarea coloanei de rășină. Se suflă orice urmă de soluție acidă rămasă cu ajutorul unui curent de aer. Se îndepărtează lichidele de spălare. Se adaugă 100 ml de metanol (punctul 3.8) în coloană și se eluează 5-10 ml; se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se lasă metanolul rămas timp de 10 minute să se echilibreze cu rășina și se continuă eluarea la o rată care să nu depășească 20 ml/min, colectând eluatul în același balon cu fundul rotund. Se evaporă metanolul pe evaporatorul rotativ cu generare de film (punctul 4.2); temperatura băii de apă trebuie să nu depășească 40 °C. Se transferă cantitativ reziduul într-un balon gradat de 10 ml, utilizând faza mobilă (punctul 3.21). Se completează până la semn cu ajutorul fazei mobile și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4). 5.4. Determinarea prin HPLC 5.4.1. Parametri Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente. Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1) Fază mobilă HPLC (punctul 3.21) Debit: 1,5-2 ml/min. Lungimea unde de detecție: 243 nm Volum de injecție: 40-100 µl. Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul 3.6.2)	faza de acetat de etil printr-un filtru de fibră de sticlă (punctul 4.6), într-o pâlnie de separare de 500 ml. Se repetă extracția eșantionului cu o a doua cantitate de 100 ml acetat de etil. Se spală extractele combinate timp de un minut cu 50 ml de soluție de carbonat de sodiu saturată cu clorură de sodiu (punctul 3.16) și se îndepărtează stratul apos. Se extrage stratul organic timp de 1 minut cu 50 ml de acid clorhidric (punctul 3.17). Se trece stratul inferior de acid printr-o pâlnie de separare de 250 ml. Se extrage din nou stratul organic timp de 1,5 minute, cu o altă cantitate de 50 ml acid clorhidric, apoi se combină cu primul extract. Se spală extractele de acid combinate prin agitare circulară timp de aproximativ 10 secunde cu 10 ml de acetat de etil (punctul 3.4). Se transferă cantitativ stratul apos într-un balon cu fund rotund de 250 ml și se îndepărtează faza organică. Se evaporă din soluția acidă tot acetatul de etil rămas utilizând un evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.2). Temperatura băii de apă nu trebuie să depășească 40 °C. Sub vid la o presiune de aproximativ 25 mbar întreaga cantitate de acetat de etil rezidual se îndepărtează în 5 minute la 38 °C. 5.3. Curățare 5.3.1. Pregătirea coloanei de Amberlit Pentru fiecare extract de eșantion se pregătește câte o coloană XAD-2. Se transferă 10 g de Amberlit preparat (punctul 3.19) într-o coloană de sticlă (punctul 4.5) cu metanol (punctul 3.8). Se adaugă un dop mic de vată de sticlă deasupra patului de rășină. Se scurge metanolul din coloană și se spală rășina cu 100 ml de apă, oprind fluxul pe măsură ce lichidul ajunge la partea superioară a patului de rășină. Se lasă coloana să se echilibreze timp de 10 minute înainte de utilizare. Niciodată nu se lasă coloana să se usuce. 5.3.2. Curățarea eșantionului	

conținând 3,0 µg/ml, până la obținerea de înălțimi (sau de arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți. 5.4.2. Curba de calibrare Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.6.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise. 5.4.3. Soluția de eșantion Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.3.2) de mai multe ori, utilizând același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de halofuginonă. 6. Calculul rezultatelor Concentrația soluției de eșantion în µg/ml se determină plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor de halofuginonă a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2). Conținutul de halofuginonă w (mg/kg) al eșantionului este dat de formula următoare: $w = \frac{c \cdot 10}{m}$ unde: c:concentrația de halofuginonă din soluția de eșantion, în µg/ml, m : greutatea porțiunii de testat, în grame. 7. Validarea rezultatelor 7.1. Identitate Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.6.2), care conține 6,0 µg/ml.	Se transferă cantitativ extractul (punctul 5.2) în partea superioară a coloanei de Amberlit preparată (punctul 5.3.1) și se eluează, îndepărtând apoi eluatul. Rata de eluare nu trebuie să depășească 20 ml/min. Se clătește balonul cu fund rotund cu 20 ml de acid clorhidric (punctul 3.17), apoi acesta se folosește pentru spălarea coloanei de rășină. Se suflă orice urmă de soluție acidă rămasă cu ajutorul unui curent de aer. Se îndepărtează lichidele de spălare. Se adaugă 100 ml de metanol (punctul 3.8) în coloană și se eluează 5-10 ml; se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se lasă metanolul rămas timp de 10 minute să se echilibreze cu rășina și se continuă eluarea la o rată care să nu depășească 20 ml/min, colectând eluatul în același balon cu fundul rotund. Se evaporă metanolul pe evaporatorul rotativ cu generare de film (punctul 4.2); temperatura băii de apă trebuie să nu depășească 40 °C. Se transferă cantitativ reziduul într-un balon gradat de 10 ml, utilizând faza mobilă (punctul 3.21). Se completează până la semn cu ajutorul fazei mobile și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4). 5.4. Determinarea prin HPLC 5.4.1. Parametri Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente. Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1) Fază mobilă HPLC (punctul 3.21) Debit: 1,5-2 ml/min. Lungimea unde de detecție: 243 nm Volum de injecție: 40-100 µl. Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul	

7.1.1. Co-cromatografie Un extract de eşantion este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.6.2). Cantitatea de halofuginonă adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de halofuginonă găsită în extractul de eşantion. După luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului, crește numai înălțimea vârfului de halofuginonă. Lărgimea vârfului, la jumătate din înălțimea sa maximă, trebuie să se încadreze într-o variație de $\pm 10\%$ din lărgimea originală. 7.1.2. Detecție cu grup de diode Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii: (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eşantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este de obicei de $\pm 2\text{ nm}$; (b) între 225 și 300 nm, spectrele eşantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon; (c) între 225 și 300 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eşantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu	3.6.2) conținând 3,0 $\mu\text{g/ml}$, până la obținerea de înălțimi (sau de arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți. 5.4.2. Curba de calibrare Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.6.2) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în $\mu\text{g/ml}$, ca abscise. 5.4.3. Soluția de eşantion Se injectează extractul de eşantion (punctul 5.3.2) de mai multe ori, utilizând același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de halofuginonă. 6. Calculul rezultatelor Concentrația soluției de eşantion în $\mu\text{g/ml}$ se determină plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor de halofuginonă a soluției de eşantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2). Conținutul de halofuginonă w (mg/kg) al eşantionului este dat de formula următoare: $w = \frac{c \cdot 10}{m} \text{ unde:}$ c: concentrația de halofuginonă din soluția de eşantion, în $\mu\text{g/ml}$, m : greutatea porțiunii de testat, în grame. 7. Validarea rezultatelor 7.1. Identitate Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de	

depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.
Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,5 mg/kg pentru un conținut de halofuginonă de până la 3 mg/kg

7.3. Recuperare

Pentru eșantionul martor îmbogățit se realizează o recuperare de minimum 80 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

A fost organizat un studiu colaborativ (26) în cadrul căruia trei eșantioane au fost analizate de opt laboratoare.

Rezultate

	Eșantionul A (martor) La primire	Eșantionul B (făină)		Eșantionul C (pelete)	
		La primire	După două luni	La primire	După două luni
Medie (mg/kg)	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.6.2), care conține 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.6.2). Cantitatea de halofuginonă adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de halofuginonă găsită în extractul de eșantion.

După luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului, crește numai înălțimea vârfului de halofuginonă. Lărgimea vârfului, la jumătate din înălțimea sa maximă, trebuie să se încadreze într-o variație de ± 10 % din lărgimea originală.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este de obicei de ± 2 nm;

(b) între 225 și 300 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon;

(c) între 225 și 300 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este

ND= nedetectat
S_R= deviația standard a reproductibilității
CV_R= coeficientul de variație a reproductibilității (%)
Rec.= recuperare %

E. DETERMINAREA ROBENIDINEI
Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidină
Conținutul de robenidină se determină prin

—
Metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau

—
prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos.

1. Obiectiv și domeniu de aplicare

Metoda permite determinarea conținutului de robenidină din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg

2. Principiu

Eșantionul se extrage cu metanol acidifiat. Extractul se usucă și o parte alicotă se curăță într-o coloană de oxid de aluminiu. Robenidina se eluează din coloană cu metanol, se concentrează și se completează până la un volum adecvat cu fază mobilă. Conținutul de robenidină se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV.

3. Reactivi

3.1. Metanol

îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.
Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 0,5 mg/kg pentru un conținut de halofugiononă de până la 3 mg/kg

7.3. Recuperare

Pentru eșantionul martor îmbogățit se realizează o recuperare de minimum 80 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

A fost organizat un studiu colaborativ (²⁶) în cadrul căruia trei eșantioane au fost analizate de opt laboratoare.

Rezultate

	Eșantionul A (martor) La primire	Eșantionul B (făină)		Eșantionul C (pelete)	
		La primi re	După două luni	La primi re	După două luni
Medie (mg/kg)	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

3.2. Metanol acidifiat Se transferă 4,0 ml de acid clorhidric ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) într-un balon gradat de 500 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.3. Acetonitril, de calitate HPLC 3.4. Sită moleculară Tip 3A, 8-12 noduri ale sitei (noduri de 1,6-2,5 mm, aluminosilicat cristalin, diametrul porilor 0,3 mm). 3.5. Oxid de aluminiu, activitate acidă grad I pentru cromatografia pe coloană Se transferă 100 g de oxid de aluminiu într-un recipient adecvat și se adaugă 2,0 ml de apă. Se închide și se agită timp de aproximativ 20 de minute. Se păstrează într-un recipient bine închis. 3.6. Soluție de fosfat diacid de potasiu, $c = 0,025 \text{ mol/l}$ Se dizolvă 3,40 g de fosfat diacid de potasiu în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn și se amestecă. 3.7. Soluție de fosfat acid disodic, $c = 0,025 \text{ mol/l}$ Se dizolvă 3,55 g de fosfat acid disodic anhidru (sau 4,45 g de dihidrat sau 8,95 g de dodecahidrat) în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 litru, se completează până la semn și se amestecă. 3.8. Fază mobilă HPLC Se amestecă următorii reactivi: 650 ml de acetonitril (punctul 3.3), 250 ml apă (de calitate HPLC), 50 ml soluție de fosfat diacid de potasiu (punctul 3.6), 50 ml soluție de fosfat acid disodic (punctul 3.7). Se trece printr-un filtru de $0,22 \mu\text{m}$ (punctul 4.6) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute). 3.9. Substanța etalon	ND= nedetectat S_R= deviația standard a reproductibilității CV_R= coeficientul de variație a reproductibilității (%) Rec.= recuperare % E. DETERMINAREA ROBENIDINEI <i>Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidină</i> Conținutul de robenidină se determină prin — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de robenidină din furaje. Limita de cuantificare este de 5 mg/kg 2. Principiu Eșantionul se extrage cu metanol acidifiat. Extractul se usucă și o parte alicotă se curăță într-o coloană de oxid de aluminiu. Robenidina se eluează din coloană cu metanol, se concentrează și se completează până la un volum adecvat cu fază mobilă. Conținutul de robenidină se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC), utilizând un detector de radiații UV. 3. Reactivi 3.1. Metanol 3.2. Metanol acidifiat	

Robenidină pură: Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenzilden)amino]guanidină. 3.9.1. Soluția etalon stoc de robenidină: 300 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 30 mg de substanță etalon de robenidină (punctul 3.9). Se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.2) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric. 3.9.2. Soluția etalon intermediară de robenidină: 12 µg/ml Se transferă 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 250 ml, se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric. 3.9.3. Soluții de calibrare Se transferă 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 și 25,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.9.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 și 6,0 µg/ml de robenidină. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate. 3.10. Apă, de calitate HPLC 4. Aparatură 4.1. Coloană de sticlă Construită din sticlă brună, prevăzută cu robinet de închidere și un rezervor cu capacitatea de aproximativ 150 ml, diametru interior 10-15 mm, lungime 250 mm. 4.2. Agitator mecanic sau magnetic 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film 4.4. Echipament HPLC cu detector de radiații UV cu lungimi de undă variabile sau cu detector cu grup de diode care funcționează în intervalul 250-400 nm 4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm x 4 mm, C₁₈, particule de 10 µm sau echivalent	Se transferă 4,0 ml de acid clorhidric ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) într-un balon gradat de 500 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.3. Acetonitril, de calitate HPLC 3.4. Sită moleculară Tip 3A, 8-12 noduri ale sitei (noduri de 1,6-2,5 mm, aluminosilicat cristalin, diametrul porilor 0,3 mm). 3.5. Oxid de aluminiu, activitate acidă grad I pentru cromatografia pe coloană Se transferă 100 g de oxid de aluminiu într-un recipient adecvat și se adaugă 2,0 ml de apă. Se închide și se agită timp de aproximativ 20 de minute. Se păstrează într-un recipient bine închis. 3.6. Soluție de fosfat diacid de potasiu, $c = 0,025$ mol/l Se dizolvă 3,40 g de fosfat diacid de potasiu în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn și se amestecă. 3.7. Soluție de fosfat acid disodic, $c = 0,025$ mol/l Se dizolvă 3,55 g de fosfat acid disodic anhidru (sau 4,45 g de dihidrat sau 8,95 g de dodecahidrat) în apă (de calitate HPLC), într-un balon gradat de 1 litru, se completează până la semn și se amestecă. 3.8. Fază mobilă HPLC Se amestecă următorii reactivi: 650 ml de acetonitril (punctul 3.3), 250 ml apă (de calitate HPLC), 50 ml soluție de fosfat diacid de potasiu (punctul 3.6), 50 ml soluție de fosfat acid disodic (punctul 3.7). Se trece printr-un filtru de 0,22 µm (punctul 4.6) și se degazează soluția (de exemplu, prin ultrasonare timp de 10 minute). 3.9. Substanța etalon	

4.5. Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă) 4.6. Filtre cu membrană, 0,22 µm 4.7. Filtre cu membrană, 0,45 µm 5. Procedura <i>Notă:</i> Robenidina este sensibilă la lumină. Pentru toate operațiile se folosește sticla brună. 5.1. Generalități 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența robenidinei și a substanțelor interferente. 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor (punctul 5.1.1) care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de robenidină, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 60 mg/kg, se transferă 3,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se evaporă soluția până la cca 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 15 g din furajul martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2). <i>Notă:</i> Pentru această metodă, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează robenidină. 5.2. Extracție Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 15 g de eșantion preparat. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se adaugă 100,0 ml metanol acidifiat (punctul 3.2), se închide și se agită timp de o oră în agitator (punctul 4.2). Se filtrează soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (punctul 4.5) și se colectează întregul filtrat într-un flacon tip Erlenmeyer de 150 ml. Se adaugă 7,5 g de sită moleculară (punctul 3.4), se închide și se agită timp de 5 minute. Se filtrează imediat prin hârtie de filtru din fibră de sticlă. Se conservă această soluție pentru etapa de purificare (punctul 5.3). 5.3. Purificare	Robenidină pură: Clorhidrat de 1,3-bis[(4-clorbenziliden)amino]guanidină. 3.9.1. Soluția etalon stoc de robenidină: 300 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 30 mg de substanță etalon de robenidină (punctul 3.9). Se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.2) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric. 3.9.2. Soluția etalon intermediară de robenidină: 12 µg/ml Se transferă 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 250 ml, se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu și se păstrează la întuneric. 3.9.3. Soluții de calibrare Se transferă 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 și 25,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.9.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu fază mobilă (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 și 6,0 µg/ml de robenidină. Soluțiile se prepară imediat înainte de a fi utilizate. 3.10. Apă, de calitate HPLC 4. Aparatură 4.1. Coloană de sticlă Construită din sticlă brună, prevăzută cu robinet de închidere și un rezervor cu capacitatea de aproximativ 150 ml, diametru interior 10-15 mm, lungime 250 mm. 4.2. Agitator mecanic sau magnetic 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film 4.4. Echipament HPLC cu detector de radiații UV cu lungimi de undă variabile sau cu detector cu grup de diode care funcționează în intervalul 250-400 nm		

5.3.1. Pregătirea coloanei de oxid de aluminiu Se introduce un tampon mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (punctul 4.1) și se împinge utilizând o baghetă de sticlă. Se cântăresc 11,0 g din oxidul de aluminiu preparat (punctul 3.5) și se transferă în coloană. Pe parcursul acestei etape este important ca expunerea la aer să fie redusă la minimum. Se lovește ușor coloana încărcată în partea inferioară pentru a permite stabilizarea oxidului de aluminiu. 5.3.2. Purificarea eșantionului Se transferă în coloană cu pipeta 5,0 ml de extract de eșantionul preparat în (punctul 5.2). Vârful pipetei se menține aproape de peretele coloanei și se permite ca soluția să fie absorbită de oxidul de aluminiu. Se eluează robenidina din coloană folosind 100 ml metanol (punctul 3.1), cu un debit de 2-3 ml/minut și se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se evaporă soluția de metanol până la uscare sub presiune redusă la 40 °C, prin intermediul unui evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.3). Se redizolvă reziduul în 3-4 ml de fază mobilă (punctul 3.8) și se transferă cantitativ într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul de mai multe ori cu cantități de 1-2 ml de fază mobilă și se transferă lichidul de clătire în balonul gradat. Se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4). 5.4. Determinarea prin HPLC 5.4.1. Parametri Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente: Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1), Fază mobilă HPLC (punctul 3.8), Debit: 1,5-2 ml/min, Lungimea de undă a detectorului: 317 nm, Volum de injecție: 20-50 μl.	4.4.1. Coloană pentru cromatografie lichidă: 300 mm x 4 mm, C₁₈, particule de 10 μm sau echivalent 4.5. Hârtie de filtru din fibră de sticlă (Whatman GF/A sau echivalentă) 4.6. Filtre cu membrană, 0,22 μm 4.7. Filtre cu membrană, 0,45 μm 5. Procedura <i>Notă:</i> Robenidina este sensibilă la lumină. Pentru toate operațiile se folosește sticla brună. 5.1. Generalități 5.1.1. Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența robenidinei și a substanțelor interferente. 5.1.2. Se efectuează un test de recuperare prin analizarea furajului martor (punctul 5.1.1) care a fost îmbogățit prin adăugarea unei cantități de robenidină, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 60 mg/kg, se transferă 3,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.9.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml. Se evaporă soluția până la cca 0,5 ml într-un curent de azot. Se adaugă 15 g din furajul martor, se amestecă și se așteaptă 10 minute înainte de a se începe etapa de extracție (punctul 5.2). <i>Notă:</i> Pentru această metodă, furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar la analiză nu se detectează robenidină. 5.2. Extracție Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 15 g de eșantion preparat. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se adaugă 100,0 ml metanol acidifiat (punctul 3.2), se închide și se agită timp de o oră în agitator (punctul 4.2). Se filtrează soluția prin hârtie de filtru din fibră de sticlă (punctul 4.5) și se colectează întregul filtrat într-un flacon tip Erlenmeyer de 150 ml. Se adaugă 7,5 g de sită moleculară (punctul 3.4), se închide și se agită timp de 5 minute. Se filtrează imediat prin hârtie de filtru din fibră de sticlă. Se	

Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul 3.9.3) conținând 3,6 µg/ml, până la obținerea de înălțimi ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți. 5.4.2. Curba de calibrare Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.9.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile sau ariile medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise. 5.4.3. Soluția de eșantion Se injectează de mai multe ori extractul de eșantion (punctul 5.3.2) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de robenidină. 6. Calculul rezultatelor Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor robenidinei din soluția de eșantion se determină concentrația în µg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2). Conținutul de robenidină w (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare: $w = \frac{c \cdot 200}{m}$ unde: c=concentrația de robenidină din soluția de eșantion, în µg/ml, m = greutatea porțiunii de testat, în grame. 7. Validarea rezultatelor 7.1. Identitate Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.9.3), care conține 6 µg/ml.	conservă această soluție pentru etapa de purificare (punctul 5.3). 5.3. Purificare 5.3.1. Pregătirea coloanei de oxid de aluminiu Se introduce un tampon mic de vată de sticlă în capătul inferior al coloanei de sticlă (punctul 4.1) și se împinge utilizând o baghetă de sticlă. Se cântăresc 11,0 g din oxidul de aluminiu preparat (punctul 3.5) și se transferă în coloană. Pe parcursul acestei etape este important ca expunerea la aer să fie redusă la minimum. Se lovește ușor coloana încărcată în partea inferioară pentru a permite stabilizarea oxidului de aluminiu. 5.3.2. Purificarea eșantionului Se transferă în coloană cu pipeta 5,0 ml de extract de eșantionul preparat în (punctul 5.2). Vârful pipetei se menține aproape de peretele coloanei și se permite ca soluția să fie absorbită de oxidul de aluminiu. Se eluează robenidina din coloană folosind 100 ml metanol (punctul 3.1), cu un debit de 2-3 ml/minut și se colectează eluatul într-un balon cu fundul rotund de 250 ml. Se evaporă soluția de metanol până la uscare sub presiune redusă la 40 °C, prin intermediul unui evaporator rotativ cu generare de film (punctul 4.3). Se redizolvă reziduul în 3-4 ml de fază mobilă (punctul 3.8) și se transferă cantitativ într-un balon gradat de 10 ml. Se clătește balonul de mai multe ori cu cantități de 1-2 ml de fază mobilă și se transferă lichidul de clătire în balonul gradat. Se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 µm (punctul 4.7). Această soluție se păstrează pentru determinarea prin HPLC (punctul 5.4). 5.4. Determinarea prin HPLC 5.4.1. Parametri	

7.1.1. Co-cromatografie Un extract de eșantion se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (punctul 3.9.3). Cantitatea de robenidină adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de robenidină constatată în extractul de eșantion. Numai înălțimea vârfului de robenidină crește după luarea în considerare a cantității adăugate și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială. 7.1.2. Detecție cu grup de diode Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii: (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm; (b) între 250 și 400 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon; (c) între 250 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când	Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente: Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.4.1), Fază mobilă HPLC (punctul 3.8), Debit: 1,5-2 ml/min, Lungimea de undă a detectorului: 317 nm, Volum de injecție: 20-50 µl. Stabilitatea sistemului cromatografic se verifică prin injectarea de mai multe ori a soluției de calibrare (punctul 3.9.3) conținând 3,6 µg/ml, până la obținerea de înălțimi ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți. 5.4.2. Curba de calibrare Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.9.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile sau ariile medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise. 5.4.3. Soluția de eșantion Se injectează de mai multe ori extractul de eșantion (punctul 5.3.2) folosind același volum ca și în cazul soluțiilor de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor pentru vârfurile de robenidină. 6. Calculul rezultatelor Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor robenidinei din soluția de eșantion se determină concentrația în µg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.4.2). Conținutul de robenidină w (mg/kg) din eșantion este dat de formula următoare: $w = \frac{c \cdot 200}{m}$ unde:	

sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim.
Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. Repetabilitate

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de robenidină mai mare de 15 mg/kg

7.3. Recuperare

Pentru un eșantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 85 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

A fost organizat un studiu prin colaborare la nivelul UE, în cursul căruia au fost analizate de către 12 laboratoare patru eșantioane, sub formă de făină sau de pelete, de hrană pentru păsări de curte și pentru iepuri. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Păsări de curte		Iepuri	
	Făină	Pelete	Făină	Pelete
Medie (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

c=concentrația de robenidină din soluția de eșantion, în µg/ml,

m = greutatea porțiunii de testat, în grame.

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion și ale soluției de calibrare (punctul 3.9.3), care conține 6 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (punctul 3.9.3). Cantitatea de robenidină adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea estimată de robenidină constatată în extractul de eșantion.

Numai înălțimea vârfului de robenidină crește după luarea în considerare a cantității adăugate și a diluției extractului. Lărgimea vârfului la jumătatea înălțimii sale maxime trebuie să se încadreze într-o variație de aproximativ 10 % din lărgimea inițială.

7.1.2. Detecție cu grup de diode

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

- (a) lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, aceasta este în mod normal de aproximativ 2 nm;
- (b) între 250 și 400 nm, spectrele eșantionului și ale etalonului, înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei, nu trebuie să fie diferite pentru acele părți

CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7	ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre două spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon; (c) între 250 și 400 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului punctului maxim. Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată. 7.2. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eșantion nu trebuie să depășească 10 % din valoarea superioară, pentru un conținut de robenidină mai mare de 15 mg/kg 7.3. Recuperare Pentru un eșantion martor îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 85 %. 8. Rezultatele unui studiu colaborativ A fost organizat un studiu prin colaborare la nivelul UE, în cursul căruia au fost analizate de către 12 laboratoare patru eșantioane, sub formă de făină sau de pelete, de hrană pentru păsări de curte și pentru iepuri. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:		
Recuperare (%)	90,0	93,3	87,2	80,2			
S _r = deviația standard a repetabilității							
S _r = coeficientul de variație a repetabilității, %							
S _R = deviația standard a reproductibilității							
CV _R = coeficientul de variație a reproductibilității, (%)							
F. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE DICLAZURIL (+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2il)fenil]-acetonitril. Conținutul de diclazuril se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de diclazuril din furaje combinate și preamestecuri (27). Limita de detecție este							
					Păsări de curte	Iepuri	

de 0,1 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 0,5 mg/kg
Limite de cuantificare mai mici sunt realizabile, dar acest lucru trebuie validat de către utilizator.

2. Principiu

După adăugarea unui standard intern, eşantionul este extras cu metanol acidifiat. Pentru furaje, o parte alicotă a extractului este purificată pe un cartuş C18 pentru extracţie în fază solidă. Diclazurilul este eluat din cartuş cu un amestec de metanol acidifiat şi apă. După evaporare, reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Pentru preamestecuri, extractul se evaporă şi reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Conţinutul de diclazuril se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (HPLC) cu gradient ternar şi cu fază inversată, prin utilizarea unui detector UV.

3. Reactivi

- 3.1. Apă, de calitate HPLC
- 3.2. Acetat de amoniu
- 3.3. Sulfat acid de tetrabutilamoniu (TBHS)
- 3.4. Acetonitril, de calitate HPLC
- 3.5. Metanol, de calitate HPLC
- 3.6. N,N-dimetilformamidă (DMF)
- 3.7. Acid clorhidric, ρ20 = 1,19 g/ml
- 3.8. Substanţă etalon: diclazuril: (+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro3,5 -dioxo-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril, cu puritate garantată
- 3.8.1. Soluţie etalon stoc de diclazuril, 500 µg/ml
Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanţă etalon de diclazuril (punctul 3.8) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) şi se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună şi se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluţia este stabilă timp de 1 lună (28).
- 3.8.2. Soluţia etalon de diclazuril, 50 µg/ml

	Făină	Pelete	Făină	Pelete
Medie (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
Recuperare (%)	90,0	93,3	87,2	80,2
s _r = deviaţia standard a repetabilităţii s _r = coeficientul de variaţie a repetabilităţii, % S _R = deviaţia standard a reproductibilităţii CV _R = coeficientul de variaţie a reproductibilităţii, (%)				
F. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE DICLAZURIL (+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2il)fenil]-acetonitril. Conţinutul de diclazuril se determină prin: — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu				

Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9. Substanță etalon intern: 2,6 diclor-α-(4-clorfenil)-4-[4,5-dihidro3,5 -dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H)-il]α-metilbenzen-acetonitril (diclazuril de metil) 3.9.1. Soluție etalon stoc internă de diclazuril, 500 μg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon internă (punctul 3.9) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9.2. Soluție etalon intern, 50 μg/ml Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc internă de etalon intern (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9.3. Soluție etalon intern pentru preamestecuri, p/1 000 mg/ml (p = conținutul nominal de diclazuril în preamestec în mg/kg) Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, p/10 mg de substanță etalon intern într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în DMF (punctul 3.6) într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.7), se completează până la semn cu DMF și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o	cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector UV, astfel cum se descrie la punctele 1-9 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de diclazuril din furaje combinate și preamestecuri (²⁷). Limita de detecție este de 0,1 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 0,5 mg/kg. Limite de cuantificare mai mici sunt realizabile, dar acest lucru trebuie validat de către utilizator. 2. Principiu După adăugarea unui standard intern, eșantionul este extras cu metanol acidifiat. Pentru furaje, o parte alicotă a extractului este purificată pe un cartuș C18 pentru extracție în fază solidă. Diclazurilul este eluat din cartuș cu un amestec de metanol acidifiat și apă. După evaporare, reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Pentru preamestecuri, extractul se evaporă și reziduul se dizolvă într-un amestec DMF/apă. Conținutul de diclazuril se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu gradient ternar și cu fază inversată, prin utilizarea unui detector UV. 3. Reactivi 3.1. Apă, de calitate HPLC 3.2. Acetat de amoniu 3.3. Sulfat acid de tetrabutilamoniu (TBHS) 3.4. Acetonitril, de calitate HPLC 3.5. Metanol, de calitate HPLC 3.6. N,N-dimetilformamidă (DMF) 3.7. Acid clorhidric, $p_{20} = 1,19$ g/ml 3.8. Substanță etalon: diclazuril: (+)-4-clorfenil [2,6-diclor-4-(2,3,4,5-tetrahidro3,5 -dioxo-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril, cu puritate garantată	

temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.10. Soluții de calibrare 3.10.1. Soluție de calibrare, 1 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 1,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 17 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.2. Soluție de calibrare, 2 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 2,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 16 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.3. Soluție de calibrare, 3 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 3,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 15 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.4. Soluție de calibrare, 4 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 4,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 14 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.5. Soluție de calibrare, 5 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 5,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 13 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare.	3.8.1. Soluție etalon stoc de diclazuril, 500 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon de diclazuril (punctul 3.8) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună (²⁸). 3.8.2. Soluția etalon de diclazuril, 50 µg/ml Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9. Substanță etalon intern: 2,6 diclor-α-(4-clorfenil)-4-[4,5-dihidro3,5 -dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H)-il]α-metilbenzen-acetonitril (diclazuril de metil) 3.9.1. Soluție etalon stoc internă de diclazuril, 500 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 25 mg de substanță etalon internă (punctul 3.9) într-un balon gradat de 50 ml. Se dizolvă în DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9.2. Soluție etalon intern, 50 µg/ml Se transferă 5,00 ml din soluția etalon stoc internă de etalon intern (punctul 3.9.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu DMF (punctul 3.6) și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în	

<i>Notă:</i> soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) acoperă concentrația de diclazuril din hrana pentru animale cuprinsă între 0,5 și 2,5 mg/kg atunci când se utilizează protocolul actual. 3.11. Cartuș C₁₈ pentru extracție în fază solidă, de exemplu Bond Elut, mărime: 20 cc, greutatea absorbentului: 5 000 mg (precon condiționare în conformitate cu orientările furnizorului). 3.12. Solvent de extracție: metanol acidifiat. Se pipetează 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.7) în 1 000 ml de metanol (punctul 3.5) și se amestecă. 3.13. Fază mobilă pentru HPLC 3.13.1. Eluent A: acetat de amoniu – soluție de sulfat acid de tetrabutilamoniu. Se dizolvă 5 g de acetat de amoniu (punctul 3.2) și 3,4 g de TBHS (punctul 3.3) în 1 000 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. 3.13.2. Eluent B: acetonitril (punctul 3.4). 3.13.3. Eluent C: metanol (punctul 3.5). 4. Aparatură 4.1. Agitator mecanic 4.2. Echipament pentru HPLC cu gradient ternar: 4.2.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, Hypersil ODS, particule de 3 μm, 100 mm × 4,6 mm sau echivalent 4.2.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film 4.4. Filtru cu membrană (de exemplu, nailon cu rezistență chimică), 0,45 μm 4.5. Seringă de unică folosință, 5 ml 4.6. Distribuitor în vid 4.7. Baie cu ultrasunete 5. Procedura 5.1. <i>Generalități</i> 5.1.1. Furaj martor	frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.9.3. Soluție etalon intern pentru preamestecuri, p/1 000 mg/ml (p = conținutul nominal de diclazuril în preamestec în mg/kg) Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, p/10 mg de substanță etalon intern într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în DMF (punctul 3.6) într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.7), se completează până la semn cu DMF și se amestecă. Se împachetează balonul în folie de aluminiu sau se utilizează un balon de culoare brună și se depozitează în frigider. La o temperatură mai mică sau egală cu 4 °C soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.10. Soluții de calibrare 3.10.1. Soluție de calibrare, 1 μg/ml (diclazuril) Se pipetează 1,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 17 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.2. Soluție de calibrare, 2 μg/ml (diclazuril) Se pipetează 2,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 16 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.3. Soluție de calibrare, 3 μg/ml (diclazuril) Se pipetează 3,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 15 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.4. Soluție de calibrare, 4 μg/ml (diclazuril)	

Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența diclazurilului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar prin analiză nu se detectează nici diclazuril, nici substanțe interferente. 5.1.2. Test de recuperare Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de diclazuril, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 1 mg/kg, se adaugă 0,1 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) la 50 g din furajul martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a continua (punctul 5.2). Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat se îmbogățește adăugând o cantitate de diclazuril similară celei deja prezente în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea poate fi calculată prin diferență. 5.2. Extracție 5.2.1. Pui de carne Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 50 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 20 ml din supernatant într-un recipient de sticlă adecvat și se diluează în 20 ml apă (punctul 3.1). Se transferă această soluție într-un cartuș de extracție (punctul 3.11) și se trece prin acesta prin aplicare de vid (punctul 4.6). Se spală cartușul cu 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă (punctul 3.1), 65 + 35 (V + V). Se elimină fracțiunile colectate și se eluează compușii	Se pipetează 4,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 14 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.5. Soluție de calibrare, 5 µg/ml (diclazuril) Se pipetează 5,00 ml din soluția etalon de diclazuril (punctul 3.8.2) și 2,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2) într-un balon gradat de 50 ml. Se adaugă 13 ml de DMF (punctul 3.6), se completează până la semn cu apă (punctul 3.1) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. <i>Notă:</i> soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) acoperă concentrația de diclazuril din hrana pentru animale cuprinsă între 0,5 și 2,5 mg/kg atunci când se utilizează protocolul actual. 3.11. Cartuș C₁₈ pentru extracție în fază solidă, de exemplu Bond Elut, mărime: 20 cc, greutatea absorbentului: 5 000 mg (precondiționare în conformitate cu orientările furnizorului). 3.12. Solvent de extracție: metanol acidifiat. Se pipetează 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.7) în 1 000 ml de metanol (punctul 3.5) și se amestecă. 3.13. Fază mobilă pentru HPLC 3.13.1. Eluent A: acetat de amoniu – soluție de sulfat acid de tetrabutilamoniu. Se dizolvă 5 g de acetat de amoniu (punctul 3.2) și 3,4 g de TBHS (punctul 3.3) în 1 000 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. 3.13.2. Eluent B: acetonitril (punctul 3.4). 3.13.3. Eluent C: metanol (punctul 3.5). 4. Aparatură 4.1. Agitator mecanic 4.2. Echipament pentru HPLC cu gradient ternar: 4.2.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, Hypersil ODS, particule de 3 µm, 100 mm × 4,6 mm sau echivalent	

cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă, 80 + 20 (V + V). Se evaporă această fracțiune până la uscare prin intermediul evaporatorului rotativ (punctul 4.3) la 60 °C. Se dizolvă reziduul în 1,0 ml DMF (punctul 3.6), se adaugă 1,5 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se filtrează printr-un filtru cu membrană (punctul 4.4) montat pe o seringă de unică folosință (punctul 4.5). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.2.2. Preamestecuri Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, aproximativ 1 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.3), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000 /p ml (p = conținutul nominal în diclazuril al preamestecului în mg/kg) din supernatant într-un balon cu fund rotund de dimensiuni adecvate. Se evaporă acest amestec până la uscare, la presiune scăzută și la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator rotativ (punctul 4.3). Se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de DMF (punctul 3.6), se adaugă 15,0 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.3. Determinarea prin HPLC 5.3.1. Parametri Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente sau mai bune. — Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm Hypersil ODS, particule de 3 μm sau echivalent. — Fază mobilă — Eluent A [3.13.1]: Soluție apoasă de acetat de amoniu și sulfat acid de tetrabutilamoniu. — Eluent B [3.13.2]: acetonitril.	4.2.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode 4.3. Evaporator rotativ cu generare de film 4.4. Filtru cu membrană (de exemplu, nailon cu rezistență chimică), 0,45 μm 4.5. Seringă de unică folosință, 5 ml 4.6. Distribuitor în vid 4.7. Baie cu ultrasunete 5. Procedura 5.1. Generalități 5.1.1. Furaj martor Se analizează un furaj martor pentru a verifica absența diclazurilului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul, iar prin analiză nu se detectează nici diclazuril, nici substanțe interferente. 5.1.2. Test de recuperare Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de diclazuril, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 1 mg/kg, se adaugă 0,1 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.8.1) la 50 g din furajul martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 minute, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a continua (punctul 5.2). Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat se îmbogățește adăugând o cantitate de diclazuril similară celei deja prezente în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea poate fi calculată prin diferență. 5.2. Extracție 5.2.1. Pui de carne	

- Eluent C [3.13.3]: metanol.
- Mod de eluare - gradient liniar
- condiții inițiale: $A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)$;
- după 10 min, eluția gradientului timp de 30 de minute până la: $A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)$;
- se clătește apoi cu B timp de 10 minute.
- Debit: 1,5-2 ml/min
- Volum de injecție: 20 μ l
- Lungimea de undă a detectorului: 280 nm.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.2) care conține 2 μ g/ml de diclazuril sau etalon intern, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. Analiza cromatografică a soluțiilor de calibrare

Se injectează de două ori 20 μ l din fiecare soluție de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.3, 3.10.4, 3.10.5 și 3.10.2), se identifică și se integrează vârfurile diclazurilului și etalonului intern și se trasează curba de calibrare pe baza raportului dintre înălțimea medie a vârfului sau aria diclazurilului și înălțimea medie a vârfului sau aria etalonului intern în raport cu concentrația de diclazuril în soluțiile de calibrare (μ g/ml).

5.3.3. Analiza cromatografică a soluțiilor eșantion

Se injectează 20 μ l din soluția de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de două ori și se determină înălțimea medie sau aria vârfurilor de diclazuril și a vârfurilor etalonului intern.

6. Calculul rezultatelor

6.1. Pui de carne

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\text{Înălțimea(d,s)}}{\text{Înălțimea(i,s)}} - b}{a} \frac{10V}{m} \text{ sau}$$

Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, aproximativ 50 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.2), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 20 ml din supernatant într-un recipient de sticlă adecvat și se diluează în 20 ml apă (punctul 3.1). Se transferă această soluție într-un cartuș de extracție (punctul 3.11) și se trece prin acesta prin aplicare de vid (punctul 4.6). Se spală cartușul cu 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă (punctul 3.1), $65 + 35 (V + V)$. Se elimină fracțiunile colectate și se eluează compușii cu ajutorul a 25 ml dintr-un amestec de solvent de extracție (punctul 3.12) și apă, $80 + 20 (V + V)$. Se evaporă această fracțiune până la uscare prin intermediul evaporatorului rotativ (punctul 4.3) la 60 °C. Se dizolvă reziduul în 1,0 ml DMF (punctul 3.6), se adaugă 1,5 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se filtrează printr-un filtru cu membrană (punctul 4.4) montat pe o seringă de unică folosință (punctul 4.5). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, aproximativ 1 g de eșantion. Se transferă într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml, se adaugă 1,00 ml din soluția etalon intern (punctul 3.9.3), 200 ml din solventul de extracție (punctul 3.12) și se astupă flaconul. Se agită amestecul în agitator (punctul 4.1) pe parcursul nopții. Se lasă să se sedimenteze timp de 10 minute. Se transferă o parte alicotă de 10 000 /p ml ($p =$ conținutul nominal în diclazuril al preamestecului în mg/kg) din supernatant într-un balon cu fund rotund de dimensiuni adecvate. Se evaporă acest amestec până la uscare, la presiune scăzută și la 60 °C, cu ajutorul unui evaporator

$$w = \frac{\frac{\text{Area(d,s)}}{\text{Aria(i,s)}} - b}{a} \frac{10V}{m}$$

unde:

— Înălțimea(d,s) este înălțimea vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— Aria(d,s) este aria vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— Înălțimea(i,s) este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— Aria(i,s) este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)

— b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— m este masa porțiunii de testat, în grame

— V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu 5.2.1 (adică 2,5 ml)

6.2. **Preamestecuri**

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\text{Înălțimea(d,s)}}{\text{Înălțimea(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}$$

· p sau

$$w = \frac{\frac{\text{Aria(d,s)}}{\text{Aria(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}$$

rotativ (punctul 4.3). Se dizolvă din nou reziduul în 10,0 ml de DMF (punctul 3.6), se adaugă 15,0 ml de apă (punctul 3.1) și se amestecă. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.3. **Determinarea prin HPLC**

5.3.1. **Parametri**

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente sau mai bune.

— Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm Hypersil ODS, particule de 3 μm sau echivalent.

— Fază mobilă

— Eluent A [3.13.1]: Soluție apoasă de acetat de amoniu și sulfat acid de tetrabutilamoniu.

— Eluent B [3.13.2]: acetonitril.

— Eluent C [3.13.3]: metanol.

— Mod de eluare - gradient liniar

— condiții inițiale: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V);

— după 10 min, eluția gradientului timp de 30 de minute până la: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V);

— se clătește apoi cu B timp de 10 minute.

— Debit: 1,5-2 ml/min

— Volum de injecție: 20 μl

— Lungimea de undă a detectorului: 280 nm.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.2) care conține 2 μg/ml de diclazuril sau etalon intern, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. **Analiza cromatografică a soluțiilor de calibrare**

Se injectează de două ori 20 μl din fiecare soluție de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.3, 3.10.4, 3.10.5 și 3.10.2), se identifică și se integrează vârfurile diclazurilului și etalonului intern și se trasează curba de calibrare pe baza raportului

· p
unde:

- Înălțimea(d,s) este înălțimea vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)
- Aria(d,s) este aria vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)
- Înălțimea(i,s) este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)
- Aria(i,s) este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)
- b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10. 2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2
- a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.
- m este masa porțiunii de testat, în grame
- V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu punctul 5.2.2 (adică 25 ml)
- p este conținutul nominal de diclazuril al preamestecului în mg/kg

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) și ale soluției de calibrare (punctul 3.10.2).

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități adecvate din soluția de calibrare (punctul 3.10.2). Cantitatea de diclazuril adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de diclazuril constatată în extractul de eșantion.

dintre înălțimea medie a vârfului sau aria diclazurilului și înălțimea medie a vârfului sau aria etalonului intern în raport cu concentrația de diclazuril în soluțiile de calibrare (μg/ml).

5.3.3. Analiza cromatografică a soluțiilor eșantion

Se injectează 20 μl din soluția de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de două ori și se determină înălțimea medie sau aria vârfurilor de diclazuril și a vârfurilor etalonului intern.

6. Calculul rezultatelor

6.1. Pui de carne

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\text{Înălțimea(d,s)}}{\text{Înălțimea(i,s)}} - b}{a} \frac{10V}{m} \text{ sau}$$

$$w = \frac{\frac{\text{Area(d,s)}}{\text{Aria(i,s)}} - b}{a} \frac{10V}{m}$$

unde:

- Înălțimea(d,s) este înălțimea vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)
- Aria(d,s) este aria vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.1)
- Înălțimea(i,s) este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)
- Aria(i,s) este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.1)
- b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

Numai înălțimea vârfului de diclazuril și a vârfului etalonului intern crește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze în $\pm 10 \%$ din lărgimea inițială a vârfului de diclazuril sau a vârfului etalonului intern al extractului de eșantion neîmbogățit.

7.1.2. **Detecție cu grup de diode**

Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii:

(a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de ± 2 nm.

(b) Între 230 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon.

(c) Între 230 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.

Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată.

7.2. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două măsurători independente efectuate pe două subeșantioane nu trebuie să depășească:

— a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2.

— m este masa porțiunii de testat, în grame

— V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu 5.2.1 (adică 2,5 ml)

6.2. **Preamestecuri**

Conținutul de diclazuril w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{\frac{\text{Înălțimea(d,s)}}{\text{Înălțimea(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}$$

· p sau

$$w = \frac{\frac{\text{Aria(d,s)}}{\text{Aria(i,s)}} - b}{a} \frac{0.02V}{m}$$

· p

unde:

— Înălțimea(d,s) este înălțimea vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Aria(d,s) este aria vârfului de diclazuril din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Înălțimea(i,s) este înălțimea vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— Aria(i,s) este aria vârfului etalonului intern din soluția eșantion (punctul 5.2.2)

— b este ordonata la origine a curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10. 2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2

— 30 % din valoarea superioară pentru un conținut în diclauril situat între 0,5 mg/kg și 2,5 mg/kg, — 0,75 mg/kg pentru un conținut în diclauril situat între 2,5 mg/kg și 5 mg/kg, — 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de diclauril mai mare de 5 mg/kg 7.3. Recuperare Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. 8. Rezultatele unui studiu colaborativ Au fost organizate două studii colaborative. În primul, efectuat de un alt grup de laboratoare în 1994, eșantioanele analizate au fost două preamestecuri (O 100, A 100) și trei eșantioane de furaje complementare pentru păsări de curte (L1, Z1, K1). Un eșantion de preamestec a fost amestecat cu o matrice organică (O 100), iar celălalt cu o matrice anorganică (A 100). Conținutul teoretic este de 100 mg de diclauril pe kg Laboratoarele au primit instrucțiuni să analizeze fiecare eșantion o singură dată sau în duplicat. (Informații detaliate privind primul studiu colaborativ figurează în <i>Journal of AOAC International</i>, vol. 77, nr. 6, 1994, p. 1359-1361). În al doilea studiu colaborativ au fost analizate trei furaje combinate pentru păsări de curte, care conțin diclauril în concentrații de 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) și furajul martor (MAT 3). (Informații detaliate privind al doilea studiu figurează în <i>JRC Technical report</i> (2016) și în <i>Journal of AOAC International</i>, vol. 102, nr. 2, 2019, p. 646-652). Rezultatele celor două studii colaborative sunt prezentate în tabelul următor.	— a este panta curbei de calibrare trasată din soluțiile de calibrare (punctele 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 și 3.10.5) în conformitate cu punctul 5.3.2. — m este masa porțiunii de testat, în grame — V este volumul final în mililitri al extractului de eșantion după redizolvare în conformitate cu punctul 5.2.2 (adică 25 ml) — p este conținutul nominal de diclauril al preamestecului în mg/kg 7. Validarea rezultatelor 7.1. Identitate Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) și ale soluției de calibrare (punctul 3.10.2). 7.1.1. Co-cromatografie Un extract de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități adecvate din soluția de calibrare (punctul 3.10.2). Cantitatea de diclauril adăugată trebuie să fie similară cu cantitatea de diclauril constatată în extractul de eșantion. Numai înălțimea vârfului de diclauril și a vârfului etalonului intern crește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze în ± 10 % din lărgimea inițială a vârfului de diclauril sau a vârfului etalonului intern al extractului de eșantion neîmbogățit. 7.1.2. Detecție cu grup de diode Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii: (a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eșantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție.	

	Eșan tion 1A 100	Eșan tion 2O 100	Eșan tion 3 L1	Eșan tion 4 Z1	Eșan tion 5 K1	Eșan tion 6 MAT 1	Eșan tion 7 MAT 2	Eșan tion 8 MAT 3	Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de ± 2 nm. (b) Între 230 și 320 nm, spectrele eșantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta analitului etalon. (c) Între 230 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eșantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanta relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanta spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei. Dacă unul din aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu a fost confirmată. 7.2. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două măsurători independente efectuate pe două subeșantioane nu trebuie să depășească: — 30 % din valoarea superioară pentru un conținut în diclazuril situat între 0,5 mg/kg și 2,5 mg/kg, — 0,75 mg/kg pentru un conținut în diclazuril situat între 2,5 mg/kg și 5 mg/kg, — 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de diclazuril mai mare de 5 mg/kg 7.3. Recuperare Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. 8. Rezultatele unui studiu colaborativ
L	11	11	11	11	6	10	9	10	
n	19	18	19	19	12	20	18	10	
Medie (m g/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LO Q	
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—	
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—	
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—	
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—	
Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—	
Referință (^{*1})	Prim ul studi u din 1 994	Prim ul studi u din 1 994	Prim ul studi u din 1 994	Prim ul studi u din 1 994	Prim ul studi u din 1 994	Al doile a studi u din 2 015	Al doile a studi u din 2 015	Al doile a studi u din 2 015	

Conținutul de lasalocid sodic se determină prin — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector spectrofluorimetric (fluorescență), astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos. 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului în lasalocid sodic din furaje. Limita de detecție este de 5 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 10 mg/kg 2. Principiu Lasalocidul sodic este extras din eșantion cu metanol acidifiat și dozat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector spectrofluorimetric (fluorescență). 3. Reactivi 3.1. Fosfat diacid de potasiu (KH₂PO₄) 3.2. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 % 3.3. Soluție de acid ortofosforic, c = 20 % Se diluează 23,5 ml acid ortofosforic (punctul 3.2) în 100 ml de apă. 3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilhexilamină), g (g/g) = 99 % 3.5. Metanol, de calitate HPLC 3.6. Acid clorhidric, densitate = 1,19 g/ml 3.7. Soluție tampon de fosfat, c = 0,01 mol/l Se dizolvă 1,36 g de KH₂PO₄ (punctul 3.1) în 500 ml de apă (punctul 3.11), se adaugă 3,5 ml de acid ortofosforic (punctul	<table><tr><td>S_r (mg/kg)</td><td>5,88</td><td>7,64</td><td>0,15</td><td>0,02</td><td>0,03</td><td>0,11</td><td>0,07</td><td>—</td><td></td></tr><tr><td>CV_r (%)</td><td>5,83</td><td>7,38</td><td>17,32</td><td>1,92</td><td>3,34</td><td>11,2</td><td>4,5</td><td>—</td><td></td></tr><tr><td>S_R (mg/kg)</td><td>7,59</td><td>7,64</td><td>0,17</td><td>0,11</td><td>0,12</td><td>0,18</td><td>0,21</td><td>—</td><td></td></tr><tr><td>CV_R (%)</td><td>7,53</td><td>7,38</td><td>18,61</td><td>9,67</td><td>13,65</td><td>18,1</td><td>14,3</td><td>—</td><td></td></tr><tr><td>Conținut nominal (mg/kg)</td><td>100</td><td>100</td><td>1,0</td><td>1,0</td><td>1,0</td><td>0,9</td><td>1,5</td><td>—</td><td></td></tr><tr><td>Referință</td><td>Primul studiu din 1994</td><td>Primul studiu din 1994</td><td>Primul studiu din 1994</td><td>Primul studiu din 1994</td><td>Primul studiu din 1994</td><td>Al doilea studiu din 2015</td><td>Al doilea studiu din 2015</td><td>Al doilea studiu din 2015</td><td></td></tr></table>	S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—		CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—		S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—		CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—		Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—		Referință	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Al doilea studiu din 2015	Al doilea studiu din 2015	Al doilea studiu din 2015	
	S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—																																																				
	CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—																																																				
	S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—																																																				
	CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—																																																				
	Conținut nominal (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—																																																				
	Referință	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Primul studiu din 1994	Al doilea studiu din 2015	Al doilea studiu din 2015	Al doilea studiu din 2015																																																				
(*) Primul studiu din 1994: Journal of AOAC International, Volumul 77, No 6, 1994, p. 1359-1361; Al doilea studiu din 2015: JRC Technical report „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study” (2016). L = număr de laboratoare n = număr de valori unice S_r = deviația standard a repetabilității CV_r = coeficientul de variație a repetabilității S_R = deviația standard a reproductibilității																																																													

3.2) și 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamină (punctul 3.4). Se ajustează pH-ul la 4,0 cu ajutorul soluției de acid ortofosforic (punctul 3.3) și se diluează cu apă completându-se până la 1 000 ml (punctul 3.11). 3.8. Metanol acidifiat Se transferă 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.6) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.5) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.9. Fază mobilă HPLC, soluție tampon de fosfat și metanol 5 + 95 (V + V) Se amestecă 5 ml de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) cu 95 ml de metanol (punctul 3.5). 3.10. Substanță etalon de lasalocid sodic cu puritate garantată, C₃₄H₅₃O₈Na (sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de <i>Streptomyces lasaliensis</i>), E 763 3.10.1. Soluție etalon stoc de lasalocid sodic, 500 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sodic (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.8), se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid sodic, 50 µg/ml Se pipetează 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.3. Soluții de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.10.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 µg de lasalocid sodic pe ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare.	CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității LOQ = Limita de cuantificare 9. Observații generale Trebuie să se demonstreze în prealabil că reacția diclazurilului este liniară pentru toată gama de concentrații măsurate. Cel puțin pentru analiza diclazurilului din furajele combinate cu un conținut ridicat de grăsime (în acest scop, care depășește 12 % grăsime), metoda analitică poate fi înlocuită cu alte metode bazate pe HPLC, de exemplu o cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS), cu condiția ca metoda alternativă să aibă caracteristici de performanță echivalente (rata de recuperare, precizia la condițiile de repetabilitate și reproductibilitate). G. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE LASALOCID SODIC <i>Sare sodică a unui acid monocarboxilic polieter, produsă de Streptomyces lasaliensis.</i> Conținutul de lasalocid sodic se determină prin — Metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu fază inversată, utilizând un detector spectrofluorimetric (fluorescență), astfel cum se descrie la punctele 1-8 de mai jos.	

3.11. Apă, de calitate HPLC 4. Aparatură 4.1. Baie cu ultrasunete (sau baie de apă cu agitare) cu reglaj de temperatură 4.2. Filtre cu membrană, 0,45 μm 4.3. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 20 μl. 4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm × 4 mm, cu fază inversată C18, particule de 5 μm sau echivalent 4.3.2. Spectrofluorimetru cu ajustare variabilă a lungimii de undă pentru excitație și emisie 5. Procedura 5.1. Generalități 5.1.1. Furaj martor Pentru a efectua testul de recuperare (punctul 5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența lasalocidului sodic și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu se detectează nici lasalocid sodic, nici substanțe interferente. 5.1.2. Test de recuperare Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de lasalocid sodic, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la 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 mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (punctul 5.2). Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de lasalocid sodic asemănătoare celei deja prezente în eșantion.	1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului în lasalocid sodic din furaje. Limita de detecție este de 5 mg/kg, iar limita de cuantificare este de 10 mg/kg 2. Principiu Lasalocidul sodic este extras din eșantion cu metanol acidifiat și dozat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu fază inversată (RP-HPLC) cu ajutorul unui detector spectrofluorimetric (fluorescență). 3. Reactivi 3.1. Fosfat diacid de potasiu (KH₂PO₄) 3.2. Acid ortofosforic, g (g/g) = 85 % 3.3. Soluție de acid ortofosforic, c = 20 % Se diluează 23,5 ml acid ortofosforic (punctul 3.2) în 100 ml de apă. 3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilhexilamină), g (g/g) = 99 % 3.5. Metanol, de calitate HPLC 3.6. Acid clorhidric, densitate = 1,19 g/ml 3.7. Soluție tampon de fosfat, c = 0,01 mol/l Se dizolvă 1,36 g de KH₂PO₄ (punctul 3.1) în 500 ml de apă (punctul 3.11), se adaugă 3,5 ml de acid ortofosforic (punctul 3.2) și 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamină (punctul 3.4). Se ajustează pH-ul la 4,0 cu ajutorul soluției de acid ortofosforic (punctul 3.3) și se diluează cu apă completându-se până la 1 000 ml (punctul 3.11). 3.8. Metanol acidifiat Se transferă 5,0 ml de acid clorhidric (punctul 3.6) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu metanol (punctul 3.5) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.9. Fază mobilă HPLC, soluție tampon de fosfat și metanol 5 + 95 (V + V)	

Acesta este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea se poate calcula prin diferență. 5.2. Extracție 5.2.1. Pentru porcine Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, de la 5 la 10 g de eșantion într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml cu dop. Se picură cu pipeta 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8). Se închide ușor și se agită circular pentru a se dispersa. Flaconul se plasează într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.2) într-un recipient adecvat. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.2.2. Preamestecuri Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 2 g de preamestec nemăcinat într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8) și se agită circular pentru a se dispersa. Se pune balonul și conținutul acestuia într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, apoi se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă bine. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 μm (punctul 4.2). Se diluează un volum adecvat de filtrat limpede cu metanol acidifiat (punctul 3.8), pentru a produce o soluție de testat finală care să conțină aproximativ 4 μg/ml de lasalocid sodic. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.3. Determinarea prin HPLC 5.3.1. Parametri	Se amestecă 5 ml de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) cu 95 ml de metanol (punctul 3.5). 3.10. Substanță etalon de lasalocid sodic cu puritate garantată, C₃₄H₅₃O₈Na (sare sodică a unui acid monocarboxilic polimer, produsă de <i>Streptomyces lasaliensis</i>), E 763 3.10.1. Soluție etalon stoc de lasalocid sodic, 500 μg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sodic (punctul 3.10) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în metanol acidifiat (punctul 3.8), se completează până la semn cu același solvent și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.2. Soluție etalon intermediară de lasalocid sodic, 50 μg/ml Se pipetează 10,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un balon gradat de 100 ml, se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Soluția se prepară imediat înainte de utilizare. 3.10.3. Soluții de calibrare Se transferă 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 ml de soluție etalon intermediară (punctul 3.10.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă. Aceste soluții corespund concentrațiilor de 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 și 10,0 μg de lasalocid sodic pe ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare. 3.11. Apă, de calitate HPLC 4. Aparatură 4.1. Baie cu ultrasunete (sau baie de apă cu agitare) cu reglaj de temperatură 4.2. Filtre cu membrană, 0,45 μm 4.3. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 20 μl. 4.3.1. Coloană pentru cromatografie lichidă, 125 mm × 4 mm, cu fază inversată C₁₈, particule de 5 μm sau echivalent	

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.3.1):	125 mm × 4 mm, cu fază inversată C ₁₈ , particule de 5 μm sau echivalent
Faza mobilă (punctul 3.9):	amestec de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) și metanol (punctul 3.5), 5 + 95 (V + V)
Debit:	1,2 ml/min
Lungimea undelor de detecție:	Excitație: 310 nm
	Emisie: 419 nm
Volum de injecție:	20 μl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.3) conținând 4,0 μg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.3.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.10.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând valorile (ariile) medii ale vârfurilor ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.

5.3.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de mai multe ori utilizând același volum cu cel reținut pentru

4.3.2. Spectrofluorimetru cu ajustare variabilă a lungimii de undă pentru excitație și emisie

5. Procedura

5.1. Generalități

5.1.1. Furaj martor

Pentru a efectua testul de recuperare (punctul 5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența lasalocidului sodic și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu se detectează nici lasalocid sodic, nici substanțe interferente.

5.1.2. Test de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de lasalocid sodic, similară cu cea prezentă în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.10.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la 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 mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (punctul 5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de lasalocid sodic asemănătoare celei deja prezente în eșantion. Acesta este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit, iar recuperarea se poate calcula prin diferență.

5.2. Extracție

5.2.1. Pentru porcine

Se cântăresc cu o abatere de 0,01 g, de la 5 la 10 g de eșantion într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml cu dop. Se picură cu pipeta 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8). Se închide ușor și se agită circular pentru a se dispersa. Flaconul se

soluția de calibrare și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor de lasalocid sodic.

6. Calculul rezultatelor

Plecând de la înălțimea (aria) medie a vârfurilor soluției de eșantion (punctul 5.3.3), se determină concentrația de lasalocid sodic (µg/ml) prin referire la curba de calibrare.

6.1. pentru porcine

Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{c \cdot V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$
 unde:

c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.1) în µg/ml

V=volumul extractului de eșantion conform 5.2.1 în ml (adică 1 100)

m = greutatea porțiunii de testat, în g

6.2. Preamestecuri

Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{c \cdot V_2 \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$
 unde:

c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.2) în µg/ml

V=volumul extractului de eșantion conform 5.2.2 în ml (adică 2 250)

f= factorul de diluție conform 5.2.2

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Metodele bazate pe spectrofluorimetrie sunt mai puțin supuse interferențelor decât cele care utilizează un detector UV.

plasează într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 µm (punctul 4.2) într-un recipient adecvat. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.2.2. Preamestecuri

Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 2 g de preamestec nemăcinat într-un balon gradat de 250 ml. Se adaugă 100,0 ml de metanol acidifiat (punctul 3.8) și se agită circular pentru a se dispersa. Se pune balonul și conținutul acestuia într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.1) la aproximativ 40 °C timp de 20 de minute, apoi se scoate și se lasă să se răcească la temperatura camerei. Se completează până la semn cu metanol acidifiat (punctul 3.8) și se amestecă bine. Se lasă în repaus timp de aproximativ 1 oră, până la decantarea materiilor în suspensie, apoi se filtrează o parte alicotă printr-un filtru cu membrană de 0,45 µm (punctul 4.2). Se diluează un volum adecvat de filtrat limpede cu metanol acidifiat (punctul 3.8), pentru a produce o soluție de testat finală care să conțină aproximativ 4 µg/ml de lasalocid sodic. Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3).

5.3. Determinarea prin HPLC

5.3.1. Parametri

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente:

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.3.1):	125 mm × 4 mm, cu fază inversată C ₁₈ , particule de 5 µm sau echivalent

Identitatea analitului poate fi confirmată de către co-cromatografie.

7.1.1. **Co-cromatografie**

Un extract de eşantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.10.3). Cantitatea de lasalocid sodic adăugată trebuie să fie asemănătoare cantității de lasalocid sodic constatată în extractul de eşantion. Numai înălțimea vârfului corespunzător lasalocidului sodic se mărește după ce s-a luat în calcul cantitatea de lasalocid sodic adăugată și diluția extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii, trebuie să se încadreze între ± 10 % din lărgimea inițială a vârfului produs de extractul de eşantion neîmbogățit.

7.2. **Repetabilitate**

Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească:

- 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 30 mg/kg și 100 mg/kg;
- 15 mg/kg pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 100 mg/kg și 200 mg/kg;
- 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic mai mare de 200 mg/kg.

7.3. **Recuperare**

Pentru un eşantion de furaj (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. Pentru eşantioanele de preamestecuri îmbogățite, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. **Rezultatele unui studiu colaborativ**

S-a realizat un studiu colaborativ [Q](#) în cursul căruia au fost analizate 2 preamestecuri (eşantioanele 1 și 2) și 5 furaje (eşantioanele 3-7) de către 12 laboratoare. Fiecare eşantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

Faza mobilă (punctul 3.9):	amestec de soluție tampon de fosfat (punctul 3.7) și metanol (punctul 3.5), 5 + 95 (V + V)
Debit:	1,2 ml/min
Lungimea undelor de detecție:	Excitație: 310 nm
	Emisie: 419 nm
Volum de injecție:	20 µl

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectând de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.10.3) conținând 4,0 µg/ml, până la obținerea de înălțimi (arii) ale vârfurilor și de timpi de retenție constanți.

5.3.2. **Curba de calibrare**

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.10.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând valorile (ariile) medii ale vârfurilor ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

5.3.3. **Soluția de eşantion**

	Eșantionul 1 Preamestec pentru pui	Eșantionul 2 Preamestec pentru curcani	Eșantionul 3 Pelete pentru curcani	Eșantionul 4 Sfărâmatul pentru pui	Eșantionul 5 Furaj pentru curcani	Eșantionul 6 Furaj pentru păsări de curte A	Eșantionul 7 Furaj pentru păsări de curte B	Eșantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) de același volum cu cel reținut pentru determinarea înălțimilor (ariile) medii ale vârfurilor de lasalocid sodic. Se injectează extractul de eșantion în același volum cu cel reținut pentru calibrare și se determină concentrația de lasalocid sodic (μg/ml) prin referire la curba de calibrare.		
L	12	12	12	12	12	12	12	Medie a vârfurilor soluției de lasalocid sodic (μg/ml) determinată la curba de calibrare.		
n	23	23	23	23	23	23	23	Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:		
Medie (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	$w = \frac{c \cdot V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$ unde: c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.1) în μg/ml V=volumul extractului de eșantion conform 5.2.1 în ml (adică 100) m = greutatea porțiunii de testat, în g					
s _r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23						
CV _r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84						
s _R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32						
CV _R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	$w = \frac{c \cdot V_2 \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$ unde: c=concentrația de lasalocid sodic a soluției de eșantion (punctul 5.2.2) în μg/ml V=volumul extractului de eșantion conform 5.2.2 în ml (adică 250)					
Conținut nominal (mg/kg)	5 000 ^{(*)2}	16 000 ^{(*)2}	80 ^{(*)2}	105 ^{(*)2}						
(*1) Analyst, 1995, 120, p. 2 175-2 180. (*2) Conținutul declarat de producător. (1) Furaj preparat în laborator. L = număr de laboratoare. n = număr de valori unice.					6.2. Preamestecuri Conținutul de lasalocid sodic w (în mg/kg) al eșantionului este dat de următoarea formulă:					

s_r = deviația standard a repetabilității. s_R = deviația standard a reproductibilității. CV_r = coeficientul de variație a repetabilității, %. CV_R = coeficientul de variație a reproductibilității, %.	f = factorul de diluție conform 5.2.2 m = greutatea porțiunii de testat, în g 7. Validarea rezultatelor 7.1. Identitate Metodele bazate pe spectrofluorimetrie sunt mai puțin supuse interferențelor decât cele care utilizează un detector UV. Identitatea analitului poate fi confirmată de către co-cromatografie.	
H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CLORHIDRAT DE AMPROLIU <i>clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu monoclorhidrat</i> 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de amproliu din furaje. Limita de detecție este de 1 mg/kg, limita de cuantificare este de 5 mg/kg 2. Principiu Eșantionul este extras cu un amestec de metanol și apă. După diluarea cu fază mobilă și filtrarea prin membrană, conținutul de amproliu se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu schimb de cationi, utilizând un detector UV. 3. Reactivi 3.1. Metanol 3.2. Acetonitril, de calitate HPLC 3.3. Apă, de calitate HPLC 3.4. Soluție de fosfat diacid de sodiu, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ Se dizolvă 13,80 g de fosfat diacid de sodiu în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă. 3.5. Soluție de perclorat de sodiu, $c = 1,6 \text{ mol/l}$	7.1.1. Co-cromatografie Un extract de eşantion (punctul 5.2.1 sau 5.2.2) este îmbogățit prin adăugarea unei cantități corespunzătoare de soluție de calibrare (punctul 3.10.3). Cantitatea de lasalocid sodic adăugată trebuie să fie asemănătoare cantității de lasalocid sodic constatată în extractul de eşantion. Numai înălțimea vârfului corespunzător lasalocidului sodic se mărește după ce s-a luat în calcul cantitatea de lasalocid sodic adăugată și diluția extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii, trebuie să se încadreze între $\pm 10 \%$ din lărgimea inițială a vârfului produs de extractul de eşantion neîmbogățit. 7.2. Repetabilitate Diferența dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe același eşantion nu trebuie să depășească: — 15 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 30 mg/kg și 100 mg/kg; — 15 mg/kg pentru un conținut de lasalocid sodic situat între 100 mg/kg și 200 mg/kg; — 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de lasalocid sodic mai mare de 200 mg/kg. 7.3. Recuperare	

Se dizolvă 224,74 g de perclorat de sodiu monohidrat în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă.

3.6. Fază mobilă pentru HPLC (a se vedea observația de la punctul 9.1).

Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Înainte de utilizare, se filtrează printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm (punctul 4.3) și se degazează soluția [de exemplu, într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4) timp de cel puțin 15 minute].

3.7. Substanță etalon: amproliu pur, clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu, E 750 (a se vedea punctul 9.2)

3.7.1. Soluție etalon stoc de amproliu, 500 μg/ml

Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de amproliu (punctul 3.7) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în 80 ml de metanol (punctul 3.1) și se plasează balonul timp de 10 minute într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4). După tratamentul cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.7.2. Soluție etalon intermediară de amproliu, 50 μg/ml

Se pipetează 5,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu solvent de extracție (punctul 3.8) și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de 1 lună.

3.7.3. Soluții de calibrare

Se transferă 0,5, 1,0 și 2,0 ml din soluția etalon intermediară (punctul 3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.6) și se amestecă. Aceste soluții corespund la 0,5, 1,0 și respectiv 2,0 μg de amproliu per ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare.

Pentru un eșantion de furaj (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 80 %. Pentru eșantioanele de preamestecuri îmbogățite, recuperarea este de cel puțin 90 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

S-a realizat un studiu colaborativ [Q](#) în cursul căruia au fost analizate 2 preamestecuri (eșantioanele 1 și 2) și 5 furaje (eșantioanele 3-7) de către 12 laboratoare. Fiecare eșantion a făcut obiectul unei duble analize. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eșanti onul 1	Eșanti onul 2	Eșanti onul 3	Eșanti onul 4	Eșanti onul 5	Eșanti onul 6	Eșanti onul 7
	Pream estec pentru pui	Pream estec pentru curca ni	Pelete pentru curca ni	Sfârâ mături pentru pui	Furaj pentru curca ni	Furaj pentru păsări de curte A	Furaj pentru păsări de curte B
	12	12	12	12	12	12	12
	23	23	23	23	23	23	23
Medie (mg/kg)	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75

[illegible]

poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de amproliu similară cu cea deja prezentă în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit și recuperarea poate fi calculată prin scădere. 5.2. Extracție 5.2.1. Preamestecuri (conținut de amproliu < 1 %) și furaje Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, între 5 și 40 g de eșantion, în funcție de conținutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml de solvent de extracție (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obține un conținut de amproliu între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă (a se vedea observația de la 9.3). Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.2.2. Preamestecuri (conținut de amproliu ≥ 1 %) Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 1-4 g de preamestec, în funcție de conținutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml și se adaugă 200 ml solvent de extracție (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) și se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete și se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obține un conținut de amproliu între 0,5 și 2 μg/ml și se amestecă. Se filtrează 5-10 ml din această soluție diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.3. Determinarea prin HPLC 5.3.1. Parametri:	H. DETERMINAREA CONȚINUTULUI DE CLORHIDRAT DE AMPROLIU <i>clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu monoclorhidrat</i> 1. Obiectiv și domeniu de aplicare Metoda permite determinarea conținutului de amproliu din furaje. Limita de detecție este de 1 mg/kg, limita de cuantificare este de 5 mg/kg 2. Principii Eșantionul este extras cu un amestec de metanol și apă. După diluarea cu fază mobilă și filtrarea prin membrană, conținutul de amproliu se determină prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) cu schimb de cationi, utilizând un detector UV. 3. Reactivi 3.1. Metanol 3.2. Acetonitril, de calitate HPLC 3.3. Apă, de calitate HPLC 3.4. Soluție de fosfat diacid de sodiu, c = 0,1 mol/l Se dizolvă 13,80 g de fosfat diacid de sodiu în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă. 3.5. Soluție de perclorat de sodiu, c = 1,6 mol/l Se dizolvă 224,74 g de perclorat de sodiu monohidrat în apă (punctul 3.3) într-un balon gradat de 1 000 ml, se completează până la semn cu apă (punctul 3.3) și se amestecă. 3.6. Fază mobilă pentru HPLC (a se vedea observația de la punctul 9.1). Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Înainte de utilizare, se filtrează printr-un filtru cu membrană de 0,22 μm (punctul	

Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 µm sau echivalent	4.3) și se degazează soluția [de exemplu, într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4) timp de cel puțin 15 minute]. 3.7. Substanță etalon: amproliu pur, clorură de 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridiniu, E 750 (a se vedea punctul 9.2) 3.7.1. Soluție etalon stoc de amproliu, 500 µg/ml Se cântăresc, cu o abatere de 0,1 mg, 50 mg de amproliu (punctul 3.7) într-un balon gradat de 100 ml, se dizolvă în 80 ml de metanol (punctul 3.1) și se plasează balonul timp de 10 minute într-o baie cu ultrasunete (punctul 4.4). După tratamentul cu ultrasunete, se aduce soluția la temperatura camerei, se completează până la semn cu apă și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.7.2. Soluție etalon intermediară de amproliu, 50 µg/ml Se pipetează 5,0 ml din soluția etalon stoc (punctul 3.7.1) într-un balon gradat de 50 ml, se completează până la semn cu solvent de extracție (punctul 3.8) și se amestecă. La o temperatură de ≤ 4 °C, soluția este stabilă timp de 1 lună. 3.7.3. Soluții de calibrare Se transferă 0,5, 1,0 și 2,0 ml din soluția etalon intermediară (punctul 3.7.2) într-o serie de baloane gradate de 50 ml. Se completează până la semn cu faza mobilă (punctul 3.6) și se amestecă. Aceste soluții corespund la 0,5, 1,0 și respectiv 2,0 µg de amproliu per ml. Soluțiile se prepară imediat înainte de utilizare. 3.8. Solvent de extracție Amestec de metanol (punctul 3.1) și apă 2 + 1 (v + v) 4. Aparatură 4.1. Echipament HPLC cu sistem de injecție, permițând injectarea de volume de 100 µl 4.1.1. Coloană pentru cromatografie lichidă de 125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 µm sau echivalent		
Faza mobilă (punctul 3.6):	Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).			
Debit:	0,7 -1 ml/min			
Lungimea unde de detecție:	264 nm			
Volum de injecție:	100 µl			

Următoarele condiții sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica și alte condiții, dacă acestea duc la rezultate echivalente.

Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.7.3) care conține 1,0 µg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.

5.3.2. Curba de calibrare

Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare

utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în µg/ml, ca abscise.

5.3.3. Soluția de eșantion

Se injectează extractul de eșantion (punctul 5.2) de mai multe ori folosind același volum ca cel utilizat pentru soluțiile de calibrare și se determină înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu.

6. Calculul rezultatelor

Din înălțimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu din soluția de eșantion se determină concentrația în µg/ml a soluției de eșantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.3.2).

Conținutul w de amproliu al eșantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă:

$$w = \frac{V \cdot c \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

unde:

V=volumul solventului de extracție (punctul 3.8), în ml, conform 5.2 (adică 200 ml)

c=concentrația de amproliu din extractul de eșantion (punctul 5.2), în µg/ml

f = factorul de diluție conform 5.2

m = greutatea porțiunii de testat, în g

7. Validarea rezultatelor

7.1. Identitate

Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eșantion (punctul 5.2) și ale soluției de calibrare (punctul 3.7.3), care conține 2,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografie

Un extract de eșantion (punctul 5.2) se îmbogățește prin adăugarea unei cantități adecvate de soluție de calibrare (punctul 3.7.3). Cantitatea de amproliu adăugată trebuie să fie

4.1.2. Detector UV cu ajustare variabilă a lungimii de undă sau detector cu grup de diode

4.2. Filtru cu membrană, material PTFE, de 0,45 µm

4.3. Filtru cu membrană, 0,22 µm

4.4. Baie cu ultrasunete

4.5. Agitator mecanic sau magnetic

5. Procedura

5.1. Generalități

5.1.1. Furaj martor

Pentru efectuarea testului de recuperare (punctul 5.1.2), se analizează un furaj martor pentru a verifica absența amproliului și a substanțelor interferente. Furajul martor este similar, ca tip, cu eșantionul; nu trebuie să se detecteze amproliu sau substanțe interferente.

5.1.2. Testul de recuperare

Se efectuează un test de recuperare prin analiza furajului martor îmbogățit prin adăugarea unei cantități de amproliu similară celei prezente în eșantion. Pentru a obține o concentrație de 100 mg/kg, se transferă 10,0 ml de soluție etalon stoc (punctul 3.7.1) într-un flacon tip Erlenmeyer de 250 ml și se evaporă soluția până la aproximativ 0,5 ml. Se adaugă 50 g de furaj martor, se amestecă bine și se lasă timp de 10 min, amestecând din nou de mai multe ori înainte de a trece la etapa de extracție (punctul 5.2).

Alternativ, dacă nu este disponibil un furaj martor similar, ca tip, cu eșantionul (a se vedea punctul 5.1.1), testul de recuperare poate fi efectuat conform metodei de adiție standard. În acest caz, eșantionul de analizat este îmbogățit cu o cantitate de amproliu similară cu cea deja prezentă în eșantion. Acest eșantion este analizat împreună cu eșantionul neîmbogățit și recuperarea poate fi calculată prin scădere.

5.2. Extracție

5.2.1. **Preamestecuri (conținut de amproliu < 1 %) și furaje**

similară cu cantitatea de amproliu constatată în extractul de eşantion. Numai înălţimea vârfului de amproliu se măreşte după luarea în considerare atât a cantităţii adăugate, cât şi a diluţiei extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălţimii sale, trebuie să se încadreze într-o variaţie de $\pm 10 \%$ din lărgimea iniţială a vârfului de amproliu din extractul de eşantion neîmbogăţit. 7.1.2. Detecţie cu grup de diode Rezultatele se evaluează în funcţie de următoarele criterii: (a) Lungimea de undă a absorbţiei maxime a spectrelor eşantionului şi etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeaşi, într-o marjă determinată de puterea de rezoluţie a sistemului de detecţie. Pentru detecţia cu grup de diode, acest interval este în general de $\pm 2 \text{ nm}$. (b) Între 210 şi 320 nm, spectrele eşantionului şi etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părţi ale spectrului situate între 10 şi 100 % din absorbanţa relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleaşi maxime şi când deviaţia dintre spectre nu depăşeşte în niciun punct observat 15 % din absorbanţa analitului etalon. (c) Între 210 şi 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim şi ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eşantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părţi ale spectrului situate între 10 şi 100 % din absorbanţa relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleaşi maxime şi când deviaţia dintre spectre nu depăşeşte în niciun punct observat 15 % din absorbanţa spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei.	Se cântăresc, cu o abatere de 0,01 g, între 5 şi 40 g de eşantion, în funcţie de conţinutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml şi se adaugă 200 ml de solvent de extracţie (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) şi se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete şi se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obţine un conţinut de amproliu între 0,5 şi 2 $\mu\text{g/ml}$ şi se amestecă (a se vedea observaţia de la 9.3). Se filtrează 5-10 ml din această soluţie diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.2.2. Preamestecuri (conţinut de amproliu $\geq 1 \%$) Se cântăresc, cu o abatere de 0,001 g, 1-4 g de preamestec, în funcţie de conţinutul de amproliu, într-un flacon tip Erlenmeyer de 500 ml şi se adaugă 200 ml solvent de extracţie (punctul 3.8). Se plasează flaconul în baia cu ultrasunete (punctul 4.4) şi se lasă timp de 15 minute. Se scoate flaconul din baia cu ultrasunete şi se agită timp de 1 oră cu agitatorul mecanic sau magnetic (punctul 4.5). Se diluează o parte alicotă din extract cu faza mobilă (punctul 3.6), pentru a se obţine un conţinut de amproliu între 0,5 şi 2 $\mu\text{g/ml}$ şi se amestecă. Se filtrează 5-10 ml din această soluţie diluată cu un filtru cu membrană (punctul 4.2). Se continuă cu determinarea prin HPLC (punctul 5.3). 5.3. Determinarea prin HPLC 5.3.1. Parametri: Următoarele condiţii sunt propuse cu titlu orientativ; se pot aplica şi alte condiţii, dacă acestea duc la rezultate echivalente.	

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 același eșantion nu trebuie să depășească: — 15 % din rezultatul superior pentru un conținut de amproliu situat între 25 mg/kg și 500 mg/kg; — 75 mg/kg pentru un conținut de amproliu situat între 500 mg/kg și 1 000 mg/kg; — 7,5 % din valoarea superioară pentru un conținut de amproliu mai mare de 1 000 mg/kg. 7.3. Recuperare Pentru un eșantion (martor) îmbogățit, recuperarea este de cel puțin 90 %. 8. Rezultatele unui studiu colaborativ S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate trei tipuri de hrană pentru păsări de curte (eșantioanele 1-3), un furaj mineral (eșantionul 4) și un preamestec (eșantionul 5). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:						Coloană pentru cromatografie lichidă (punctul 4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA cu schimb de cationi, particule de 5 sau 10 μm sau echivalent		
						Faza mobilă (punctul 3.6):	Amestec de acetonitril (punctul 3.2), soluție de fosfat diacid de sodiu (punctul 3.4) și soluție de perclorat de sodiu (punctul 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).		
						Debit:	0,7 -1 ml/min		
						Lungimea unde de detecție:	264 nm		
						Volum de injecție:	100 μl		
						Se verifică stabilitatea sistemului cromatografic, injectându-se de mai multe ori soluția de calibrare (punctul 3.7.3) care conține 1,0 μg/ml, până când se obțin valori de vârf și timpi de retenție constanți.			
						5.3.2. Curba de calibrare			
						Se injectează fiecare soluție de calibrare (punctul 3.7.3) de mai multe ori și se determină înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor pentru fiecare concentrație. Se trasează o curbă de calibrare utilizând înălțimile (ariile) medii ale vârfurilor soluțiilor de calibrare ca ordonate și concentrațiile corespunzătoare, în μg/ml, ca abscise.			
						5.3.3. Soluția de eșantion			
	Eșantion 1 (furaj martor)	Eșantion 2	Eșantion 3	Eșantion 4	Eșantion 5				
L	14	14	14	14	15				

n	56	56	56	56	60	Se injectează extractul de eşantion (punctul 5.2) de mai multe ori folosind acelaşi volum ca cel utilizat pentru soluţiile de calibrare şi se determină înălţimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu. 6. Calculul rezultatelor Din înălţimea (aria) medie a vârfurilor de amproliu din soluţia de eşantion se determină concentraţia în µg/ml a soluţiei de eşantion prin referire la curba de calibrare (punctul 5.3.2). Conţinutul w de amproliu al eşantionului, exprimat în mg/kg, este dat de următoarea formulă: $w = \frac{V \cdot c \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$ unde: V=volumul solventului de extracţie (punctul 3.8), în ml, conform 5.2 (adică 200 ml) c=concentraţia de amproliu din extractul de eşantion (punctul 5.2), în µg/ml f = factorul de diluţie conform 5.2 m = greutatea porţiunii de testat, în g 7. Validarea rezultatelor 7.1. <i>Identitate</i> Identitatea analitului poate fi confirmată prin co-cromatografie sau prin utilizarea unui detector cu grup de diode care permite compararea spectrelor extractului de eşantion (punctul 5.2) şi ale soluţiei de calibrare (punctul 3.7.3), care conţine 2,0 µg/ml. 7.1.1. Co-cromatografie Un extract de eşantion (punctul 5.2) se îmbogăţeşte prin adăugarea unei cantităţi adecvate de soluţie de calibrare (punctul 3.7.3). Cantitatea de amproliu adăugată trebuie să		
medie (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140			
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550			
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20			
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760			
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00			
conţinut nominal [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000			

L: număr de laboratoare n: număr de valori unice s_r: deviația standard a repetabilității CV_r: coeficientul de variație a repetabilității s_R: deviația standard a reproductibilității CV_R: coeficientul de variație a reproductibilității	fie similară cu cantitatea de amproliu constatată în extractul de eşantion. Numai înălțimea vârfului de amproliu se mărește după luarea în considerare atât a cantității adăugate, cât și a diluției extractului. Lărgimea vârfului, la jumătatea înălțimii sale, trebuie să se încadreze într-o variație de $\pm 10 \%$ din lărgimea inițială a vârfului de amproliu din extractul de eşantion neîmbogățit. 7.1.2. Detecție cu grup de diode Rezultatele se evaluează în funcție de următoarele criterii: (a) Lungimea de undă a absorbției maxime a spectrelor eşantionului și etalonului, înregistrată la vârful cel mai înalt al cromatogramei, trebuie să fie aceeași, într-o marjă determinată de puterea de rezoluție a sistemului de detecție. Pentru detecția cu grup de diode, acest interval este în general de $\pm 2 \text{ nm}$.	
9. Observații 9.1. Dacă eşantionul conține tiamină, vârful tiaminei din cromatogramă apare puțin înaintea vârfului de amproliu. Conform acestei metode, amproliul și tiamina trebuie să fie separate. Dacă amproliul și tiamina nu sunt separate de coloana (punctul 4.1.1) utilizată în această metodă, se înlocuiește cu metanol până la 50 % din porția de acetonitril a fazei mobile (punctul 3.6). 9.2. Conform Farmacopeei Britanice, spectrul soluției de amproliu (c = 0,02 mol/l) în acid clorhidric (c = 0,1 mol/l) prezintă valori maxime la 246 nm și 262 nm. Absorbanța este de 0,84 la 246 nm și de 0,80 la 262 nm. 9.3. Extractul trebuie să fie întotdeauna diluat cu faza mobilă, altfel timpul de reținere al vârfului de amproliu se poate schimba în mod semnificativ din cauza variațiilor forței ionice. I. DETERMINAREA NARAZINULUI Conținutul de nazarin se determină prin —	(b) Între 210 și 320 nm, spectrele eşantionului și etalonului înregistrate la vârful cel mai înalt al cromatogramei nu trebuie să fie diferite pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța analitului etalon. (c) Între 210 și 320 nm, spectrele curbei ascendente, ale punctului maxim și ale curbei descendente ale vârfului produs de extractul de eşantion nu trebuie să fie diferite unele de altele pentru acele părți ale spectrului situate între 10 și 100 % din absorbanța relativă. Acest criteriu este îndeplinit atunci când sunt prezente aceleași maxime și când deviația dintre spectre nu depășește în niciun punct observat 15 % din absorbanța spectrului celui mai înalt vârf al cromatogramei. Dacă unul dintre aceste criterii nu este îndeplinit, prezența analitului nu este confirmată.	

metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de EN ISO 14183 Hrană pentru animale – Determinarea conţinutului de monensin, narazin şi salinomicină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană

J. DETERMINAREA NICARBAZINULUI

Conţinutul de nicarbazin se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de EN 15782 Hrană pentru animale – Determinarea nicarbazinului – Metodă cromatografică lichidă de înaltă performanţă.

K. DETERMINAREA DECOCHINATULUI

Conţinutul de decochinat se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de

7.2. **Repetabilitate**

Diferenţa dintre rezultatele a două determinări paralele efectuate pe acelaşi eşantion nu trebuie să depăşească:

— 15 % din rezultatul superior pentru un conţinut de amproliu situat între 25 mg/kg şi 500 mg/kg;

— 75 mg/kg pentru un conţinut de amproliu situat între 500 mg/kg şi 1 000 mg/kg;

— 7,5 % din valoarea superioară pentru un conţinut de amproliu mai mare de 1 000 mg/kg.

7.3. **Recuperare**

Pentru un eşantion (martor) îmbogăţit, recuperarea este de cel puţin 90 %.

8. Rezultatele unui studiu colaborativ

S-a realizat un studiu colaborativ în cursul căruia au fost analizate trei tipuri de hrană pentru păsări de curte (eşantioanele 1-3), un furaj mineral (eşantionul 4) şi un preamestec (eşantionul 5). Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos:

	Eşantion 1 (furaj martor)	Eşanti on 2	Eşanti on 3	Eşanti on 4	Eşanti on 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
medie (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140

înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau — metoda prevăzută de EN 16162 Hrană pentru animale – Determinarea decochinatului prin HPLC cu detectarea fluorescenței. L. DETERMINAREA MONENSINULUI Conținutul de monensin se determină prin — metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de EN ISO 14183 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană. M. DETERMINAREA SALINOMICINULUI Conținutul de salinomycin se determină prin — metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de EN ISO 14183 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană. N. DETERMINAREA SEMDURAMICINULUI	s_r [mg/kg] — 2,26 3,57 178 550				
	CV_r [%] — 4,95 1,90 3,46 2,20				
	s_R [mg/kg] — 2,95 11,8 266 760				
	CV_R [%] — 6,47 6,27 5,19 3,00				
	conținut nominal [mg/kg] — 50 200 5 000 25 000				
	L: număr de laboratoare n: număr de valori unice s_r: deviația standard a repetabilității CV_r: coeficientul de variație a repetabilității s_R: deviația standard a reproductibilității CV_R: coeficientul de variație a reproductibilității				
	9. Observații				

Conținutul de semduramicin se determină prin: — metoda de analiză prevăzută de EN 17299 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de EN ISO 16158 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de semduramicin – Metodă cromatografică lichidă prin utilizarea unei abordări de tip „ramificat”. O. STANDARDE EN Pentru aplicarea articolului 34 alineatul (2) litera (a) din Regulamentul (UE) 2017/625, sunt relevante următoarele standarde EN: EN ISO 30024 Hrană pentru animale – Determinarea activității fitazei EN 17050 Hrană pentru animale – Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea iodului din furaje prin ICP-MS EN 17550 Hrană pentru animale: Determinarea carotenoidelor în furajele combinate și în preamestecuri prin cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție UV (HPLC-UV) EN 15784 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Bacillus</i> spp. EN 15785 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Izolarea și enumerarea <i>Bifidobacterium</i> spp. EN 15786 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Pediococcus</i> spp. EN 15787 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Lactobacillus</i> spp. utilizat ca aditiv furajer	9.1. Dacă eșantionul conține tiamină, vârful tiaminei din cromatogramă apare puțin înaintea vârfului de amproliu. Conform acestei metode, amproliul și tiamina trebuie să fie separate. Dacă amproliul și tiamina nu sunt separate de coloana (punctul 4.1.1) utilizată în această metodă, se înlocuiește cu metanol până la 50 % din porția de acetonitril a fazei mobile (punctul 3.6). 9.2. Conform Farmacopeei Britanice, spectrul soluției de amproliu (c = 0,02 mol/l) în acid clorhidric (c = 0,1 mol/l) prezintă valori maxime la 246 nm și 262 nm. Absorbanța este de 0,84 la 246 nm și de 0,80 la 262 nm. 9.3. Extractul trebuie să fie întotdeauna diluat cu faza mobilă, altfel timpul de reținere al vârfului de amproliu se poate schimba în mod semnificativ din cauza variațiilor forței ionice. I. DETERMINAREA NARAZINULUI Conținutul de nazarin se determină prin — metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană J. DETERMINAREA NICARBAZINULUI Conținutul de nicarbazin se determină prin: — metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la	

EN 15788 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea <i>Enterococcus (E. faecium)</i> spp. utilizat ca aditiv furajer EN 15789 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Detectarea şi enumerarea <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizată ca aditiv furajer EN 15510 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, molibdenului şi plumbului prin ICP-AES (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt şi molibden) EN 15621 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului şi cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES (pentru analiza aditivului furajer cobalt) EN 16159 Hrană pentru animale – Determinarea seleniului prin spectrometrie de absorbţie atomică cu generare de hidruri (HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic şi 30 % peroxid de hidrogen) (pentru analiza aditivului furajer seleniu) EN 17053: Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele şi a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă) (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt, molibden şi seleniu).	nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de SM EN 15782:2017 Hrană pentru animale – Determinarea nicarbazinului – Metodă cromatografică lichidă de înaltă performanţă. K. DETERMINAREA DECOCHINATULUI Conţinutul de decochinat se determină prin: — metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS), sau — metoda prevăzută de SM EN 16162:2017 Hrană pentru animale – Determinarea decochinatului prin HPLC cu detectarea fluorescenţei. L. DETERMINAREA MONENSINULUI Conţinutul de monensin se determină prin — metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – screeningul şi determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv şi de contaminare încrucişată de 1 % şi 3 %, precum şi a coccidiostaticelor neînregistrate şi a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanţă – detecţie spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau — metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017 Hrană pentru animale – Determinarea conţinutului de		

monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană.

M. DETERMINAREA SALINOMICINULUI

Conținutul de salinomycin se determină prin

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020

Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 14183:2016/AC:2017

Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de monensin, narazin și salinomycină – Metodă cromatografică lichidă prin derivatizare post-coloană.

N. DETERMINAREA SEMDURAMICINULUI

Conținutul de semduramicin se determină prin:

— metoda de analiză prevăzută de SM EN 17299:2020

Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – screeningul și determinarea coccidiostaticelor autorizate la nivel de aditiv și de contaminare încrucișată de 1 % și 3 %, precum și a coccidiostaticelor neînregistrate și a unui antibiotic la niveluri de subaditiv, în furajele combinate cu cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție spectrometrică de masă în tandem (LC-MS/MS); sau

— metoda prevăzută de SM EN ISO 16158 Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de semduramicin – Metodă cromatografică lichidă prin utilizarea unei abordări de tip „ramificat”.

O. STANDARDE SM EN

Pentru aplicarea art. 32 alin. (2) lit. (a) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, sunt relevante următoarele standarde SM EN:

SM EN ISO 30024:2024 Hrană pentru animale – Determinarea activității fitazei SM EN 17050:2018 Hrană pentru animale – Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea iodului din furaje prin ICP-MS SM EN 17550:2022 Hrană pentru animale: Determinarea carotenoidelor în furajele combinate și în preamestecuri prin cromatografie lichidă de înaltă performanță – detecție UV (HPLC-UV) SM EN 15784:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Bacillus</i> spp. SM EN 15785:2017 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Izolarea și enumerarea <i>Bifidobacterium</i> spp. SM EN 15786:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Pediococcus</i> spp. SM EN 15787:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Lactobacillus</i> spp. utilizat ca aditiv furajer SM EN 15788:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Enterococcus</i> (<i>E. faecium</i>) spp. utilizat ca aditiv furajer SM EN 15789:2022 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Detectarea și enumerarea <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizată ca aditiv furajer SM EN 15510:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, fierului, zincului, cuprului, manganului, cobaltului, moliбdenului și plumbului		

	prin ICP-AES (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt și molibden) SM EN 15621:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea calciului, sodiului, fosforului, magneziului, potasiului, sulfului, fierului, zincului, cuprului, manganului și cobaltului după dizolvarea sub presiune prin ICP-AES (pentru analiza aditivului furajer cobalt) SM EN 16159:2017 Hrană pentru animale – Determinarea seleniului prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen) (pentru analiza aditivului furajer seleniu) SM EN 17053:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă) (pentru analiza aditivilor furajeri cobalt, molibden și seleniu).		
<i>ANEXA V</i> METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL SUBSTANȚELOR NEDORITE DIN FURAJE A. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI <i>CAPITOLUL I</i> <i>METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE INTERPRETARE A REZULTATELOR ANALITICE</i> 1. Domeniu de aplicare și definiții Eșantioanele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați de tipul dioxinelor (PCB-uri) (29) și PCB-uri care nu sunt de tipul	Anexă nr.5 METODE DE ANALIZĂ PENTRU CONTROLUL SUBSTANȚELOR NEDORITE DIN FURAJE A. DETERMINAREA NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI <i>CAPITOLUL I</i> <i>METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE INTERPRETARE A REZULTATELOR ANALITICE</i> 1. Domeniu de aplicare și definiții Eșantioanele destinate controlului oficial al nivelurilor de p-dibenzodioxine policlorurate (PCDD-uri), dibenzofurani policlorurați (PCDF-uri), bifenili policlorurați de tipul	Compatibil	

dioxinelor din furaje sunt prelevate în conformitate cu dispozițiile din anexa I. Se aplică cerințele cantitative privind controlul substanțelor sau produselor repartizate uniform în furaje, așa cum sunt prevăzute la punctul 5.1 din anexa I. Eșantioanele agregat astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în eșantioanele de laborator se stabilește dacă se respectă nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE. În sensul prezentei părți, se aplică definițiile menționate în anexa I la Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2021/808 al Comisiei (³⁰). În plus față de aceste definiții, în sensul prezentei părți se aplică următoarele definiții: „Metode de screening” înseamnă metode utilizate pentru selectarea eșantioanelor cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Ele permit o capacitate sporită de analiză a eșantioanelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau metode GC-MS. Rezultatele de la eșantioanele care depășesc valoarea-limită utilizată pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală printr-o metodă de confirmare. „Metode de confirmare” înseamnă metode care furnizează informații complete sau complementare care permit identificarea și cuantificarea certă a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la pragul maxim sau, la nevoie, la pragul de acțiune. Aceste metode utilizează cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă de înaltă	dioxinelor (PCB-uri) (²⁹) și PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor din furaje sunt prelevate în conformitate cu dispozițiile din anexa nr. 1 . Se aplică cerințele cantitative privind controlul substanțelor sau produselor repartizate uniform în furaje, așa cum sunt prevăzute la punctul 5.1 din anexa nr.1. Eșantioanele agregat astfel obținute se consideră reprezentative pentru loturile sau subloturile din care sunt prelevate. Pe baza nivelurilor determinate în eșantioanele de laborator se stabilește dacă se respectă nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020. În sensul prezentei părți, se aplică definițiile menționate la Norma sanitară veterinară privind metodele analitice pentru reziduurile de substanțe farmacologic active utilizate la animalele de la care se obțin produse alimentare și la interpretarea rezultatelor, aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 721/2023. În plus față de aceste definiții, în sensul prezentei părți se aplică următoarele definiții: „Metode de screening” înseamnă metode utilizate pentru selectarea eșantioanelor cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Ele permit o capacitate sporită de analiză a eșantioanelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Metodele de screening se bazează pe metode bioanalitice sau metode GC-MS. Rezultatele de la eșantioanele care depășesc valoarea-limită utilizată pentru verificarea conformității cu nivelul maxim trebuie să fie verificate printr-o nouă analiză completă din proba originală printr-o metodă de confirmare. „Metode de confirmare” înseamnă metode care furnizează informații complete sau complementare care permit		

rezoluție (GC-HRMS) sau cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS). 2. Conformitatea lotului sau a sublotului cu nivelul maxim 2.1. În ceea ce privește PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul analitic al sumei PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180 (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor) nu depășește nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă (31). Lotul sau sublotul nu respectă nivelul maxim prescris de Directiva 2002/32/CE în cazul în care media celor două rezultate analitice ale estimării superioare (32) obținută printr-o analiză duplicat (33), luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă, depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, adică, pentru a evalua conformitatea, se folosește concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă. Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim. Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate pentru o a doua expertiză sau pentru referință, se aplică reglementările naționale. 2.2. Referitor la PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul unei singure analize	identificarea și cuantificarea certă a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor la pragul maxim sau, la nevoie, la pragul de acțiune. Aceste metode utilizează cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă de înaltă rezoluție (GC-HRMS) sau cromatografia în fază gazoasă/spectrometria de masă în tandem (GC-MS/MS). 2. Conformitatea lotului sau a sublotului cu nivelul maxim 2.1. În ceea ce privește PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul analitic al sumei PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 și PCB 180 (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor) nu depășește nivelul maxim prescris la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020, ținând cont de incertitudinea de măsurare extinsă (31). Lotul sau sublotul nu respectă nivelul maxim prescris la aceeași hotărâre în cazul în care media celor două rezultate analitice ale estimării superioare (32) obținută printr-o analiză duplicat (33), luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă, depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, adică, pentru a evalua conformitatea, se folosește concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă. Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim. Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate	

efectuate printr-o metodă de screening, cu o rată a rezultatelor fals conforme sub 5 %, indică faptul că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE; — efectuate printr-o metodă de confirmare, nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute de Directiva 2002/32/CE, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă. Pentru testele de screening, se stabilește o valoare-limită pentru deciziile privind conformitatea eșantioanelor cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD-uri/PCDF-uri, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Lotul sau sublotul este considerat neconform cu nivelul maxim conform Directivei 2002/32/CE dacă media celor două rezultate analitice ale estimării superioare (³⁴) obținute în urma unei analize duplicat (³⁵) depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă, adică pentru a evalua conformitatea, este utilizată concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă. Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim. Se utilizează suma incertitudinilor extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.	pentru o a doua expertiză sau pentru referință, se aplică reglementările naționale. 2.2. Referitor la PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor Lotul sau sublotul respectă nivelul maxim în cazul în care rezultatul unei singure analize — efectuate printr-o metodă de screening, cu o rată a rezultatelor fals conforme sub 5 %, indică faptul că nivelul nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020; — efectuate printr-o metodă de confirmare, nu depășește nivelul maxim respectiv de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020, luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă. Pentru testele de screening, se stabilește o valoare-limită pentru deciziile privind conformitatea eșantioanelor cu nivelurile maxime respective stabilite fie pentru PCDD-uri/PCDF-uri, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Lotul sau sublotul este considerat neconform cu nivelul maxim conform Cerințelor sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr. 910/2020 dacă media celor două rezultate analitice ale estimării superioare (³⁴) obținute în urma unei analize duplicat (³⁵) depășește dincolo de orice îndoială rezonabilă nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă, adică pentru a evalua conformitatea, este utilizată concentrația analizată după ce s-a dedus incertitudinea de măsurare extinsă.	

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau pentru referință, se aplică reglementările naționale.

3. Rezultate care depășesc pragurile de acțiune stabilite în anexa II la Directiva 2002/32/CE

Pragurile de acțiune servesc ca instrument pentru selectarea eșantioanelor în cazurile în care este necesar să se identifice o sursă de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor eșantioane. În cazul în care sunt necesare eforturi importante pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea, s-ar putea să fie adecvat să se confirme depășirea pragurilor de acțiune printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă (³⁶).

CAPITOLUL II

PREGĂTIREA EȘANTIOANELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. Domeniu de aplicare

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCDD/PCDF substituie la pozițiile 2,3,7,8 și PCB-uri de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea eșantioanelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005 al Parlamentului European și al Consiliului (³⁷).

Incertitudinea de măsurare extinsă se calculează utilizându-se un coeficient de acoperire cu valoarea 2, care conferă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. Un lot sau un sublot nu este conform dacă media valorilor măsurate minus incertitudinea extinsă a mediei este mai mare decât nivelul maxim.

Se utilizează suma incertitudinilor extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

Normele menționate la paragrafele de mai sus din cadrul acestui punct se aplică pentru rezultatul analitic obținut pe proba pentru controlul oficial. În cazul analizei efectuate în scop de apărare sau pentru referință, se aplică reglementările naționale.

3. Rezultate care depășesc pragurile de acțiune stabilite la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020

Pragurile de acțiune servesc ca instrument pentru selectarea eșantioanelor în cazurile în care este necesar să se identifice o sursă de contaminare și să se ia măsuri pentru reducerea sau eliminarea acesteia. Metodele de screening stabilesc valori-limită corespunzătoare pentru selectarea acelor eșantioane. În cazul în care sunt necesare eforturi importante pentru a identifica o sursă și pentru a reduce sau elimina contaminarea, s-ar putea să fie adecvat să se confirme depășirea pragurilor de acțiune printr-o analiză duplicat folosind o metodă de confirmare și luându-se în considerare incertitudinea de măsurare extinsă (³⁶).

CAPITOLUL II

PREGĂTIREA EȘANTIOANELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR

Monitorizarea prezenței PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în furaje poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode analitice: (a) Metode de screening Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor eșantioane cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Metodele de screening trebuie să garanteze o capacitate sporită de analiză a eșantioanelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Aplicarea lor trebuie să urmărească evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS. Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare-limită, determinând o decizie de tip da/nu în legătură cu eventuala depășire a nivelului maxim sau a pragului de acțiune. Concentrația PCDD-urilor/PCDF-urilor și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din eșantioanele suspectate a fi neconforme cu nivelul maxim trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare. În plus, metodele de screening pot oferi o indicație a nivelului de PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prezente în probă. În cazul aplicării metodelor bioanalitice de screening, rezultatul se exprimă ca echivalente bioanalitice (BEQ), iar în cazul aplicării metodelor GC-MS fizico-chimice se exprimă ca echivalente toxice (TEQ). Rezultatele exprimate numeric ale metodelor de screening sunt utile pentru a dovedi conformitatea sau suspiciunea de neconformitate sau depășirea pragurilor de acțiune și oferă o indicație a intervalului în care se situează nivelurile în vederea monitorizării prin metode de confirmare. Acestea nu sunt adecvate pentru scopuri precum evaluarea nivelurilor de fond, aprecierea prelevării, urmărirea tendințelor	DE DIOXINE (PCDD/PCDF) ȘI DE PCB-URI DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE 1. Domeniu de aplicare Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de PCDD/PCDF substituie la pozițiile 2,3,7,8 și PCB-uri de tipul dioxinelor, precum și în ceea ce privește pregătirea eșantioanelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020. Monitorizarea prezenței PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în furaje poate fi efectuată cu două tipuri diferite de metode analitice: (a) Metode de screening Obiectivul metodelor de screening este selectarea acelor eșantioane cu niveluri de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor care depășesc nivelurile maxime sau pragurile de acțiune. Metodele de screening trebuie să garanteze o capacitate sporită de analiză a eșantioanelor, eficientă din punctul de vedere al costurilor, sporind astfel șansa de a descoperi noi incidente cu un nivel mare de expunere și riscuri de sănătate importante pentru consumatori. Aplicarea lor trebuie să urmărească evitarea rezultatelor fals conforme. Ele pot să cuprindă metode bioanalitice și metode GC-MS. Metodele de screening compară rezultatul analitic cu o valoare-limită, determinând o decizie de tip da/nu în legătură cu eventuala depășire a nivelului maxim sau a pragului de acțiune. Concentrația PCDD-urilor/PCDF-urilor și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din eșantioanele suspectate a fi neconforme cu nivelul maxim	

pe care le urmează nivelurile în timp sau reevaluarea pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. (b) Metode de confirmare Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații depline la nivel de congeneri individuali. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a pragurilor de acțiune, inclusiv confirmarea rezultatelor obținute prin metodele de screening. În plus, rezultatele pot fi folosite și pentru alte scopuri, precum determinarea nivelurilor de fond scăzute în monitorizarea furajelor, urmărirea tendințelor în timp, evaluarea expunerii și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru a confirma respectarea sau nerespectarea nivelului maxim, se poate utiliza, de asemenea, GC-MS/MS. 2. Context Pentru calcularea concentrațiilor echivalentelor toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător (a se vedea nota de subsol 1 de la capitolul I) și apoi se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri. În sensul prezentei părți A, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener individual înseamnă conținutul minim al unui analit care poate fi măsurat cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute la nivel internațional, de exemplu, EN 16215:2012 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor	trebuie determinate sau confirmate printr-o metodă de confirmare. În plus, metodele de screening pot oferi o indicație a nivelului de PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor prezente în probă. În cazul aplicării metodelor bioanalitice de screening, rezultatul se exprimă ca echivalente bioanalitice (BEQ), iar în cazul aplicării metodelor GC-MS fizico-chimice se exprimă ca echivalente toxice (TEQ). Rezultatele exprimate numeric ale metodelor de screening sunt utile pentru a dovedi conformitatea sau suspiciunea de neconformitate sau depășirea pragurilor de acțiune și oferă o indicație a intervalului în care se situează nivelurile în vederea monitorizării prin metode de confirmare. Acestea nu sunt adecvate pentru scopuri precum evaluarea nivelurilor de fond, aprecierea prelevării, urmărirea tendințelor pe care le urmează nivelurile în timp sau reevaluarea pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. (b) Metode de confirmare Metodele de confirmare permit identificarea și cuantificarea fără echivoc a PCDD-urilor/PCDF-urilor și PCB-urilor de tipul dioxinelor prezente într-o probă și oferă informații depline la nivel de congeneri individuali. Prin urmare, aceste metode permit controlarea nivelurilor maxime și a pragurilor de acțiune, inclusiv confirmarea rezultatelor obținute prin metodele de screening. În plus, rezultatele pot fi folosite și pentru alte scopuri, precum determinarea nivelurilor de fond scăzute în monitorizarea furajelor, urmărirea tendințelor în timp, evaluarea expunerii și crearea unei baze de date pentru eventuala reevaluare a pragurilor de acțiune și a nivelurilor maxime. Acestea sunt, de asemenea, importante pentru stabilirea modelelor pentru congeneri în scopul de a identifica sursa unei posibile contaminări. Astfel de metode utilizează GC-HRMS. Pentru a confirma respectarea sau	

de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite. Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi identificată drept: (a) concentrația unui analit din extractul unui eșantion care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie monitorizată printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul de date primare cel mai puțin intens; sau (b) în cazul în care, din motive tehnice, calculul raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile, punctul cel mai mic de concentrație de pe o curbă de calibrare care oferă o deviație acceptabilă ($\leq 30\%$) și coerentă (măsurată cel puțin la începutul și la sfârșitul unei serii analitice de eșantioane) de la factorul de răspuns relativ mediu calculat pentru toate punctele de pe curba de calibrare pentru fiecare serie de eșantioane. Limita de cuantificare (LOQ) se calculează de la cel mai mic punct de concentrație ținând seama de recuperarea etaloanelor interne și de prelevarea de eșantioane. Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație (³⁸) a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ) pentru a ține cont de faptul că nu toți compușii prezenți într-un extract de probă care produce un răspuns în cadrul testului pot să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ. Metodele de screening și de confirmare pot fi aplicate pentru controlul unei anumite matrice numai dacă metodele sunt suficient de sensibile pentru a detecta în mod fiabil niveluri la pragul de acțiune sau nivelul maxim. 3. Cerințe de asigurare a calității 3.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză.	nerespectarea nivelului maxim, se poate utiliza, de asemenea, GC-MS/MS. 2. Context Pentru calcularea concentrațiilor echivalentelor toxice (TEQ), concentrațiile fiecărei substanțe dintr-o probă dată se înmulțesc cu factorul de echivalență toxică (TEF) corespunzător (a se vedea nota de subsol 1 de la capitolul I) și apoi se adună pentru a obține concentrația totală de compuși de tipul dioxinelor exprimată ca TEQ-uri. În sensul prezentei părți A, limita specifică acceptată de cuantificare a unui congener individual înseamnă conținutul minim al unui analit care poate fi măsurat cu certitudine statistică rezonabilă și îndeplinește criteriile de identificare, astfel cum sunt descrise în standarde recunoscute la nivel internațional, de exemplu, SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS). Limita de cuantificare a unui congener individual poate fi identificată drept: (a) concentrația unui analit din extractul unui eșantion care produce un răspuns instrumental la doi ioni diferiți care urmează să fie monitorizată printr-un raport S/Z (semnal/zgomot) de 3:1 pentru semnalul de date primare cel mai puțin intens; sau (b) în cazul în care, din motive tehnice, calculul raportului semnal/zgomot nu furnizează rezultate fiabile, punctul cel mai mic de concentrație de pe o curbă de calibrare care oferă o deviație acceptabilă ($\leq 30\%$) și coerentă (măsurată cel puțin la începutul și la sfârșitul unei serii analitice de eșantioane) de la factorul de răspuns relativ mediu calculat pentru toate punctele de pe curba de calibrare pentru fiecare serie de eșantioane. Limita de cuantificare (LOQ) se calculează de la cel mai mic punct de concentrație	

3.2. Eșantioanele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe. 3.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj. 3.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu care s-a dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm). Probele se usucă înainte de mărunțire, dacă conținutul de umiditate este prea mare. 3.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ. 3.6. Se realizează o analiză-martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă. 3.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se verifica dacă sunt liberi de compuși care perturbă detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD-uri/PCDF-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia. 3.8. Cantitatea de probă utilizată pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile nivelurilor maxime sau pragul de acțiune. 3.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional, și anume EN ISO 6498. 4. Cerințe pentru laboratoare	ținând seama de recuperarea etaloanelor interne și de prelevarea de eșantioane. Metodele bioanalitice de screening nu vor da rezultate la nivel de congener, ci doar o indicație (³⁸) a nivelului TEQ, exprimată în echivalente bioanalitice (BEQ) pentru a ține cont de faptul că nu toți compușii prezenți într-un extract de probă care produce un răspuns în cadrul testului pot să îndeplinească toate cerințele principiului TEQ. Metodele de screening și de confirmare pot fi aplicate pentru controlul unei anumite matrice numai dacă metodele sunt suficient de sensibile pentru a detecta în mod fiabil niveluri la pragul de acțiune sau nivelul maxim. 3. Cerințe de asigurare a calității 3.1. Se iau măsuri pentru a se evita contaminarea încrucișată la fiecare etapă a procedurii de eșantionare și de analiză. 3.2. Eșantioanele se depozitează și se transportă în recipiente de sticlă, aluminiu, polipropilenă sau polietilenă corespunzătoare pentru depozitare, fără nicio influență asupra nivelurilor de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din probe. Urmele de praf de hârtie se îndepărtează de pe recipientul pentru probe. 3.3. Depozitarea și transportul probelor se efectuează astfel încât să se păstreze integritatea probei de furaj. 3.4. În măsura în care acest lucru este relevant, fiecare probă de laborator se mărunțește și se amestecă cu grijă printr-un procedeu care s-a dovedit că realizează o omogenizare completă (de exemplu, proba mărunțită astfel încât să treacă printr-o sită cu ochiuri de 1 mm). Probele se usucă înainte de mărunțire, dacă conținutul de umiditate este prea mare. 3.5. Se efectuează controlul reactivilor, al sticlăriei și al echipamentului pentru o posibilă influență a rezultatelor pe bază de TEQ sau BEQ. 3.6. Se realizează o analiză-martor parcurgând întreaga procedură analitică, însă fără probă.	

4.1. În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) 2017/625, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. Trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCDD/F-urilor și a PCB-urilor (³⁹). 4.2. Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de furaje și în intervalele de concentrații relevante. 4.3. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare, atât pentru controlul calității, cât și pentru confirmarea rezultatului analitic al probelor suspectate. 5. Cerințe de bază privind procedura analitică pentru dioxine (PCDD/F-uri) și PCB-uri de tipul dioxinelor 5.1. <i>Intervalul de lucru la niveluri mici și limitele de cuantificare</i> Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt de ordinul femtogramelor (10-15g), extremitatea superioară a intervalului, din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este deja suficientă. Pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor substituiți non-orto), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor (10-12g). Pentru toți	3.7. Pentru metodele bioanalitice, toată sticlăria și toți solvenții utilizați în cadrul analizei sunt testați pentru a se verifica dacă sunt liberi de compuși care perturbă detectarea compușilor-țintă în intervalul de lucru. Sticlăria se clătește cu solvenți sau se încălzește la temperaturi adecvate pentru a elimina urmele de PCDD-uri/PCDF-uri, de compuși de tipul dioxinelor și de compuși interferenți de pe suprafața acesteia. 3.8. Cantitatea de probă utilizată pentru extracție este suficientă pentru a îndeplini cerințele referitoare la un interval de lucru suficient de redus, inclusiv concentrațiile nivelurilor maxime sau pragul de acțiune. 3.9. Procedurile specifice de pregătire a probelor utilizate pentru produsele avute în vedere urmează orientări recunoscute la nivel internațional, și anume SM EN ISO 6498:2016. 4. Cerințe pentru laboratoare 4.1. În conformitate cu dispozițiile Legii 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul SM ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului SM EN ISO/IEC 17025:2018. Trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCDD/F-urilor și a PCB-urilor (³⁹). 4.2. Competența laboratoarelor se demonstrează prin participarea continuă și cu succes la studiile interlaboratoare pentru determinarea PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor în matricele de furaje și în intervalele de concentrații relevante. 4.3. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă	

ceilalți congeneri PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este suficientă. 5.2. <i>Selectivitate (specificitate) mare</i> 5.2.1. Este necesar să se facă o distincție între PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași și care pot să interfereze, prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele GC-MS, este necesar să se facă deosebirea între diferiții congeneri, cum ar fi între cei toxici (de exemplu, cele 17 PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și cele 12 PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri. 5.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate fals neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate fals conforme. 5.3. <i>Acuratețe ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului)</i> 5.3.1. Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea ridicată este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unei probe din cauza fiabilității reduse a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin <i>autenticitate</i> (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit pe un material certificat și valoarea sa certificată, exprimată ca procent din această valoare) și <i>precizie</i> (deviația standard relativă RSD_R calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate). 5.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de calibrare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de determinarea-	cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare, atât pentru controlul calității, cât și pentru confirmarea rezultatului analitic al probelor suspectate. 5. <i>Cerințe de bază privind procedura analitică pentru dioxine (PCDD/F-uri) și PCB-uri de tipul dioxinelor</i> 5.1. <i>Intervalul de lucru la niveluri mici și limitele de cuantificare</i> Pentru PCDD-uri/PCDF-uri, cantitățile detectabile sunt de ordinul femtogramelor (10-15g), extremitatea superioară a intervalului, din cauza toxicității extreme a unora dintre acești compuși. Pentru majoritatea congenerilor PCB, limita de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este deja suficientă. Pentru măsurarea congenerilor PCB-urilor de tipul dioxinelor mai toxici (în special a congenerilor substituiți non-orto), extremitatea inferioară a intervalului de lucru ajunge la niveluri mici de ordinul picogramelor (10-12g). Pentru toți ceilalți congeneri PCB, o limită de cuantificare de ordinul nanogramelor (10-9 g) este suficientă. 5.2. <i>Selectivitate (specificitate) mare</i> 5.2.1. Este necesar să se facă o distincție între PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor și o multitudine de alți compuși coextrași și care pot să interfereze, prezenți în concentrații cu până la câteva ordine de mărime mai mari decât cele ale analiților de interes. Pentru metodele GC-MS, este necesar să se facă deosebirea între diferiții congeneri, cum ar fi între cei toxici (de exemplu, cele 17 PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8 și cele 12 PCB-uri de tipul dioxinelor) și alți congeneri. 5.2.2. Metodele bioanalitice sunt capabile să detecteze compușii-țintă ca sumă de PCDD/F-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor. Curățarea probelor are drept scop eliminarea compușilor care duc la rezultate fals neconforme sau a compușilor care pot atenua răspunsul, ducând la rezultate fals conforme.	

martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin metoda de confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și antagoniste), calitatea de ajustare a curbei sau diferențele dintre valorile factorilor de echivalență toxică (TEF) și ale potenței relative (REP). Recuperarea aparentă a biotestului se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului de interes. 5.4. Validarea în intervalul nivelului maxim și măsuri generale de control al calității 5.4.1. Laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului maxim, de exemplu, 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim, cu un coeficient de variație acceptabil pentru analize repetate, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină. 5.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale matorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică graficele de control al calității pentru controalele matorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor. 5.5. Limita de cuantificare 5.5.1. Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea limitei de cuantificare (LOQ) nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să dovedească că se poate face distincție între valoarea-martor și valoarea-limită. La furnizarea unui nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Nivelul de raportare se dovedește a fi diferit de probele-	5.3. Acuratețe ridicată (autenticitate și precizie, recuperare aparentă a biotestului) 5.3.1. Pentru metodele GC-MS, determinarea oferă o estimare valabilă a concentrației reale dintr-o probă. Acuratețea ridicată este necesară pentru a se evita respingerea rezultatului analizei unei probe din cauza fiabilității reduse a nivelului TEQ determinat. Acuratețea se exprimă prin <i>autenticitate</i> (diferența dintre valoarea medie măsurată pentru un analit pe un material certificat și valoarea sa certificată, exprimată ca procent din această valoare) și <i>precizie</i> (deviația standard relativă RSD_R calculată pe baza rezultatelor generate în condiții de reproductibilitate). 5.3.2. Pentru metodele bioanalitice, se determină recuperarea aparentă a biotestului. Recuperarea aparentă a biotestului înseamnă nivelul BEQ calculat pornind de la curba de calibrare a TCDD sau PCB 126 corectată în funcție de determinarea-martor și apoi divizată la nivelul TEQ determinat prin metoda de confirmare. Aceasta vizează corectarea factorilor cum ar fi pierderea de PCDD-uri/PCDF-uri și compuși de tipul dioxinelor în timpul etapelor de extracție și curățare, coextragerea compușilor care duc la intensificarea sau atenuarea răspunsului (efecte agoniste și antagoniste), calitatea de ajustare a curbei sau diferențele dintre valorile factorilor de echivalență toxică (TEF) și ale potenței relative (REP). Recuperarea aparentă a biotestului se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele pentru congeneri reprezentativi în jurul nivelului de interes. 5.4. Validarea în intervalul nivelului maxim și măsuri generale de control al calității 5.4.1. Laboratoarele demonstrează performanța unei metode în intervalul nivelului maxim, de exemplu, 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim, cu un coeficient de variație acceptabil pentru	

martor din cadrul procedurii cel puțin cu un factor de trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test-martor.

5.5.2. Limita de cuantificare (LOQ) pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. Criterii analitice

Pentru rezultate fiabile în urma metodelor de confirmare sau de screening, trebuie să fie respectate următoarele criterii în intervalul nivelului maxim pentru valoarea TEQ sau, respectiv, BEQ, indiferent dacă este determinată ca TEQ total sau BEQ total (ca sumă de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor) sau separat pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor:

	Screening cu metode bioanalitice chimice sau fizico-	Metode de confirmare
Rată fals conforme (*1)	< 5 %	
Autenticitate		între -20 % și 20 %
Repetabilitate (RSD _r)	< 20 %	
Precizie intermediară (RSD _R)	< 25 %	< 15 %
(*1) În raport cu nivelurile maxime.		

analize repetate, în timpul procedurii de validare și în timpul analizei de rutină.

5.4.2. Ca măsuri interne de control al calității, se efectuează periodic controale ale martorului, experimente cu îmbogățire sau analize ale unor probe de control (dacă este posibil, cu material de referință certificat). Se înregistrează și se verifică graficele de control al calității pentru controalele martorului, experimentele cu îmbogățire sau analizele unor probe de control, pentru a se garanta că performanța analitică este conformă cerințelor.

5.5. Limita de cuantificare

5.5.1. Pentru o metodă bioanalitică de screening, stabilirea limitei de cuantificare (LOQ) nu este o cerință indispensabilă, însă metoda trebuie să dovedească că se poate face distincție între valoarea-martor și valoarea-limită. La furnizarea unui nivel BEQ, se stabilește un nivel de raportare pentru a se lua decizii legate de probele care prezintă un răspuns sub acest nivel. Nivelul de raportare se dovedește a fi diferit de probele-martor din cadrul procedurii cel puțin cu un factor de trei, cu un răspuns inferior intervalului de lucru. Prin urmare, se calculează pornind de la probe care conțin compușii-țintă în jurul nivelului minim necesar, și nu de la un raport S/Z sau un test-martor.

5.5.2. Limita de cuantificare (LOQ) pentru o metodă de confirmare se situează la aproximativ o cincime din nivelul maxim.

5.6. Criterii analitice

Pentru rezultate fiabile în urma metodelor de confirmare sau de screening, trebuie să fie respectate următoarele criterii în intervalul nivelului maxim pentru valoarea TEQ sau, respectiv, BEQ, indiferent dacă este determinată ca TEQ total sau BEQ total (ca sumă de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor) sau separat pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor:

5.7. Cerințe specifice pentru metodele de screening 5.7.1. Pot fi folosite pentru screening atât metodele GC-MS, cât și metodele bioanalitice. Pentru metodele GC-MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7. 5.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare. 5.7.3. Performanța metodei de screening trebuie verificată în timpul analizei de rutină, printr-un control al calității analizelor și printr-o validare continuă a metodei. Trebuie să existe un program continuu pentru controlul rezultatelor conforme. 5.7.4. Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității: 20 % din extracatele de probe sunt măsurate în screeningul de rutină cu și fără 2,3,7,8-TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de pragul de acțiune, pentru a verifica dacă răspunsul este, eventual, suprimat de către substanțele interferente prezente în extractul de probă. Concentrația măsurată a probei îmbogățite se compară cu suma concentrației extractului neîmbogățit, plus concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este cu peste 25 % mai mică decât concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă este supusă analizei de confirmare prin GC-HRMS. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității. 5.7.5. Controlul calității probelor conforme: Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, sunt confirmate prin GC-HRMS. 5.7.6. Determinarea ratelor rezultatelor fals conforme pornind de la datele de control al calității:		Screening cu metode bioanalitice sau fizico-chimice	Metode de confirmare		
	Rată fals conformă (*1)	< 5 %			
	Autenticitate			între -20 % și 20 %	
	Repetabilitate (RSD _r)	< 20 %			
	Precizie intermediară (RSD _R)	< 25 %		< 15 %	
	(*1) În raport cu nivelurile maxime.				
	5.7. Cerințe specifice pentru metodele de screening 5.7.1. Pot fi folosite pentru screening atât metodele GC-MS, cât și metodele bioanalitice. Pentru metodele GC-MS, trebuie respectate cerințele prevăzute la punctul 6. Pentru metodele bioanalitice bazate pe celule, sunt prevăzute cerințe specifice la punctul 7. 5.7.2. Laboratoarele care aplică metode de screening pentru controlul de rutină al probelor stabilesc o cooperare strânsă cu laboratoarele care aplică metoda de confirmare. 5.7.3. Performanța metodei de screening trebuie verificată în timpul analizei de rutină, printr-un control al calității analizelor și printr-o validare continuă a metodei. Trebuie să existe un program continuu pentru controlul rezultatelor conforme. 5.7.4. Verificarea posibilei suprimări a răspunsului celular și a citotoxicității:				

Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele rezultatelor fals conforme reale trebuie să fie sub 5 %. Atunci când, în urma controlului de calitate al probelor conforme, sunt disponibile cel puțin 20 de rezultate confirmate per matrice/grup de matrice, concluziile privind rata rezultatelor fals conforme trebuie să fie desprinse din această bază de date. Rezultatele probelor analizate prin intermediul testărilor interlaboratoare sau în timpul incidentelor de contaminare, care acoperă un interval de concentrații de până la, de exemplu, $2 \times$ nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei rezultatelor fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse. Deși testele de screening au, preferabil, ca scop detectarea probelor care depășesc pragul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor rezultatelor fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare. 5.7.7. Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului se verifică întotdeauna printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă analitică de confirmare. Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor fals neconforme. Pentru metodele de screening, rata rezultatelor fals neconforme este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat în legătură cu proba că este potențial neconformă. Evaluarea avantajelor metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă. 5.7.8. În condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ.	20 % din extractele de probe sunt măsurate în screeningul de rutină cu și fără 2,3,7,8-TCDD care se adaugă în funcție de nivelul maxim sau de pragul de acțiune, pentru a verifica dacă răspunsul este, eventual, suprimat de către substanțele interferente prezente în extractul de probă. Concentrația măsurată a probei îmbogățite se compară cu suma concentrației extractului neîmbogățit, plus concentrația cu îmbogățire. Dacă această concentrație măsurată este cu peste 25 % mai mică decât concentrația (suma) calculată, aceasta indică posibilitatea eliminării semnalului, iar proba respectivă este supusă analizei de confirmare prin GC-HRMS. Rezultatele sunt monitorizate prin grafice de control al calității. 5.7.5. Controlul calității probelor conforme: Aproximativ 2-10 % din probele conforme, în funcție de matricea probei și de experiența laboratorului, sunt confirmate prin GC-HRMS. 5.7.6. Determinarea ratelor rezultatelor fals conforme pornind de la datele de control al calității: Se determină rata rezultatelor fals conforme care rezultă din screeningul probelor sub și peste nivelul maxim sau pragul de acțiune. Ratele rezultatelor fals conforme reale trebuie să fie sub 5 %. Atunci când, în urma controlului de calitate al probelor conforme, sunt disponibile cel puțin 20 de rezultate confirmate per matrice/grup de matrice, concluziile privind rata rezultatelor fals conforme trebuie să fie desprinse din această bază de date. Rezultatele probelor analizate prin intermediul testărilor interlaboratoare sau în timpul incidentelor de contaminare, care acoperă un interval de concentrații de până la, de exemplu, $2 \times$ nivelul maxim (NM), pot fi, de asemenea, incluse în cele cel puțin 20 de rezultate pentru evaluarea ratei rezultatelor fals conforme. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse.	

Și pentru metodele bioanalitice efectuate în condiții de repetabilitate, valoarea RSD_r intralaborator ar fi, în general, mai mică decât în condiții de reproductibilitate (RSD_R) 6. Cerințe specifice privind metodele GC-MS care trebuie respectate în scop de screening sau de confirmare 6.1. <i>Diferențe acceptabile între estimarea superioară și estimarea inferioară a rezultatelor OMS-TEQ</i> Diferența dintre nivelul estimării superioare și cel al estimării inferioare nu depășește 20 % pentru confirmarea depășirii nivelului maxim sau în cazul în care sunt necesare praguri de acțiune. 6.2. <i>Controlul recuperărilor</i> 6.2.1. La începutul metodei de analiză, de exemplu, înaintea fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ^{13}C și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C, pentru a se valida procedura analitică. Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra- până la octo-clorurate de PCDD/F-uri și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB-uri de tipul dioxinelor (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă utilizat pentru monitorizarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, trebuie utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8, marcate cu ^{13}C și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ^{13}C. 6.2.2. De asemenea, se determină factorii de răspuns relativ pentru acei congengeri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ^{13}C, utilizându-se soluții de calibrare corespunzătoare. 6.2.3. Pentru furajele de origine vegetală și furajele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie	Deși testele de screening au, preferabil, ca scop detectarea probelor care depășesc pragul de acțiune, criteriul de determinare a ratelor rezultatelor fals conforme este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă a metodei de confirmare. 5.7.7. Probele potențial neconforme care rezultă în urma screeningului se verifică întotdeauna printr-o nouă analiză completă a probei originale printr-o metodă analitică de confirmare. Aceste probe pot fi, de asemenea, folosite pentru a evalua rata rezultatelor fals neconforme. Pentru metodele de screening, rata rezultatelor fals neconforme este procentul rezultatelor confirmate ca fiind conforme în urma analizei de confirmare, în timp ce, în screeningul anterior, s-a declarat în legătură cu proba că este potențial neconformă. Evaluarea avantajelor metodei de screening se bazează pe compararea probelor fals neconforme cu numărul total de probe verificate. Această rată este suficient de scăzută pentru a face ca utilizarea unui instrument de screening să fie avantajoasă. 5.7.8. În condiții de validare, metodele bioanalitice oferă o indicație valabilă a nivelului TEQ, calculat și exprimat ca BEQ. Și pentru metodele bioanalitice efectuate în condiții de repetabilitate, valoarea RSD_r intralaborator ar fi, în general, mai mică decât în condiții de reproductibilitate (RSD_R) 6. Cerințe specifice privind metodele GC-MS care trebuie respectate în scop de screening sau de confirmare 6.1. <i>Diferențe acceptabile între estimarea superioară și estimarea inferioară a rezultatelor OMS-TEQ</i> Diferența dintre nivelul estimării superioare și cel al estimării inferioare nu depășește 20 % pentru confirmarea depășirii nivelului maxim sau în cazul în care sunt necesare praguri de acțiune. 6.2. <i>Controlul recuperărilor</i>	

adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru furajele de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înainte extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne.

6.2.4. Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).

6.2.5. Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele p-dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening prin GC-MS, recuperările trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %.

6.3. *Eliminarea substanțelor interferente*

— Separarea PCDD/PCDF-urilor de compușii clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și bifenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumină și/sau cărbune).

— Separarea izomerilor prin cromatografie în fază gazoasă este < 25 % de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Calibrarea cu curba standard*

Intervalul curbei de calibrare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau praguri de acțiune.

6.5. *Criterii specifice pentru metodele de confirmare*

— Pentru GC-HRMS:

6.2.1. La începutul metodei de analiză, de exemplu, înainte fazei de extracție, trebuie să se adauge etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite cu clor la pozițiile 2,3,7,8 și marcate cu ¹³C și etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ¹³C, pentru a se valida procedura analitică. Trebuie adăugat cel puțin un congener pentru fiecare din grupele omoloage tetra- până la octo-clorurate de PCDD/F-uri și cel puțin un congener pentru fiecare dintre grupele omoloage de PCB-uri de tipul dioxinelor (alternativ, cel puțin un congener pentru fiecare funcție de înregistrare a ionului selecționat prin spectrometrie de masă utilizat pentru monitorizarea PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor). În cazul metodelor de confirmare, trebuie utilizate toate cele 17 etaloane interne de PCDD-uri/PCDF-uri substituite la pozițiile 2,3,7,8, marcate cu ¹³C și toate cele 12 etaloane interne de PCB-uri de tipul dioxinelor marcate cu ¹³C.

6.2.2. De asemenea, se determină factorii de răspuns relativ pentru acei congeneri pentru care nu se adaugă niciun analog marcat cu ¹³C, utilizându-se soluții de calibrare corespunzătoare.

6.2.3. Pentru furajele de origine vegetală și furajele de origine animală care conțin mai puțin de 10 % grăsime, este obligatorie adăugarea etaloanelor interne înainte de extracție. Pentru furajele de origine animală care conțin mai mult de 10 % grăsime, etaloanele interne se pot adăuga fie înainte extracției, fie după extracția grăsimii. Se procedează la o validare corespunzătoare a eficacității extracției, în funcție de etapa în care se introduc etaloanele interne.

6.2.4. Înaintea analizei GC-MS, trebuie să se adauge unul sau două etaloane de recuperare (surogat).

6.2.5. Este necesar controlul recuperării. Pentru metodele de confirmare, recuperările de etaloane interne individuale trebuie să se situeze în intervalul 60-120 %. Se acceptă și

În HRMS, rezoluția caracteristică trebuie să fie mai mare sau egală cu 10 000 pentru întregul interval al maselor, cu o concavitate de 10 %. Îndeplinirea criteriilor de identificare și confirmare suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite. — Pentru GC-MS/MS: Monitorizarea a cel puțin doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs, pentru toți analiții etichetați și neetichetați din domeniul de aplicare al analizei. Toleranța maximă admisă a intensităților relative ale ionilor de $\pm 15\%$ pentru ionii de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (medie din standardele de calibrare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia de coliziune și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit. Rezoluția fiecărui cuadropol trebuie să fie stabilită ca fiind egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: rezoluție suficientă pentru a separa două vârfuri ale unei unități de masă) în scopul de a reduce la minimum interferențele posibile cu analiții de interes. Îndeplinirea criteriilor suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul EN 16215:2012 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS) și/sau în metodele EPA 1613 și 1668 revizuite, cu excepția obligației de a utiliza GC-HRMS. 7. Cerințe specifice pentru metodele bioanalitice	recuperări inferioare sau superioare pentru congeneri individuali, în special pentru unele p-dibenzodioxine și unii dibenzofurani hepta- și octo-clorurați, atât timp cât contribuția acestora la valoarea TEQ nu depășește 10 % din valoarea TEQ totală (bazată pe suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor). Pentru metodele de screening prin GC-MS, recuperările trebuie să se situeze în intervalul 30-140 %. 6.3. Eliminarea substanțelor interferente — Separarea PCDD/PCDF-urilor de compușii clorurați interferenți, cum sunt PCB-urile care nu sunt de tipul dioxinelor și bifenileterii clorurați, se realizează prin tehnici cromatografice adecvate (de preferință pe coloană de florisil, alumina și/sau cărbune). — Separarea izomerilor prin cromatografie în fază gazoasă este $< 25\%$ de la pic la pic între 1,2,3,4,7,8-HxCDF și 1,2,3,6,7,8-HxCDF. 6.4. Calibrarea cu curba standard Intervalul curbei de calibrare trebuie să acopere intervalul relevant de niveluri maxime sau praguri de acțiune. 6.5. Criterii specifice pentru metodele de confirmare — Pentru GC-HRMS: În HRMS, rezoluția caracteristică trebuie să fie mai mare sau egală cu 10 000 pentru întregul interval al maselor, cu o concavitate de 10 %. Îndeplinirea criteriilor de identificare și confirmare suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS). — Pentru GC-MS/MS: Monitorizarea a cel puțin doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs, pentru toți	

Metodele bioanalitice sunt metode bazate pe utilizarea de principii biologice precum testele pe bază de celule sau de receptori sau imunodozări. Prezentul punct stabilește cerințe pentru metodele bioanalitice în general. O metodă de screening, în principiu, clasifică o probă ca fiind conformă sau suspectată a fi neconformă. În acest scop, nivelul BEQ calculat este comparat cu valoarea-limită (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând o analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ echivalent cu două treimi din nivelul maxim poate servi drept valoare-limită, cu condiția să se asigure o rată a rezultatelor fals conforme de sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori-limită corespunzătoare ale biotestelor pentru PCDD-uri/PCDF-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al pragului de acțiune respectiv este considerat adecvat ca valoare-limită. Dacă un nivel indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele probelor trebuie să fie în intervalul de lucru și să depășească limita de raportare (a se vedea punctele 7.1.1 și 7.1.6). 7.1. Evaluarea răspunsului la test 7.1.1. Condiții generale — Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de calibrare a TCDD, valorile la extremitățile superioare ale curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care acest CV este mai mic de 15 %. Extremitatea inferioară a intervalului de lucru (limita de raportare) se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii. Extremitatea superioară a	analizii etichetați și neetichetați din domeniul de aplicare al analizei. Toleranța maximă admisă a intensităților relative ale ionilor de $\pm 15 \%$ pentru ionii de tranziție selecționați produși în comparație cu valorile calculate sau măsurate (medie din standardele de calibrare), aplicând condiții MS/MS identice, în special energia de coliziune și presiunea gazului de coliziune, pentru fiecare tranziție a unui analit. Rezoluția fiecărui cuadropol trebuie să fie stabilită ca fiind egală sau mai mare decât rezoluția unității de masă (rezoluția unității de masă: rezoluție suficientă pentru a separa două vârfuri ale unei unități de masă) în scopul de a reduce la minimum interferențele posibile cu analiții de interes. Îndeplinirea criteriilor suplimentare, astfel cum sunt descrise în standardele recunoscute la nivel internațional, de exemplu, în standardul SM EN 16215:2021 (Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de dioxină, a PCB-urilor de tip dioxină și a indicatorilor PCB prin GC-HRMS), cu excepția obligației de a utiliza GC-HRMS. 7. Cerințe specifice pentru metodele bioanalitice Metodele bioanalitice sunt metode bazate pe utilizarea de principii biologice precum testele pe bază de celule sau de receptori sau imunodozări. Prezentul punct stabilește cerințe pentru metodele bioanalitice în general. O metodă de screening, în principiu, clasifică o probă ca fiind conformă sau suspectată a fi neconformă. În acest scop, nivelul BEQ calculat este comparat cu valoarea-limită (a se vedea punctul 7.3). Probele sub valoarea-limită sunt declarate conforme, probele egale sau peste valoarea-limită sunt suspectate a fi neconforme, necesitând o analiză printr-o metodă de confirmare. În practică, un nivel BEQ echivalent cu două treimi din nivelul maxim poate servi drept valoare-limită, cu condiția să se asigure o rată a rezultatelor fals conforme de sub 5 % și o rată acceptabilă pentru rezultate	

intervalului de lucru este, de obicei, reprezentată de valoarea EC₇₀ (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru se stabilește în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 7.3) se situează în intervalul de lucru. — Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate în triplicat sau cel puțin în duplicat. Atunci când se utilizează duplicate, o soluție etalon sau un extract de control testată (testat) în patru până la șase godeuri repartizate pe placă trebuie să producă un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %. 7.1.2. Calibrarea 7.1.2.1. Calibrarea cu curba standard — Nivelurile din probe se estimează prin compararea răspunsului la test cu o curbă de calibrare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/PCDF/PCB de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă. — Curbele de calibrare conțin între opt și 12 concentrații (cel puțin în duplicate), cu concentrații suficiente în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Ca atare, valoarea R² are valoare redusă sau nicio valoare în estimarea calității ajustării în regresia nelineară. Se ajunge la o ajustare mai bună prin reducerea la minimum a diferenței între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minimum a sumei pătratelor rezidualelor. — Nivelul estimat din extractul de probă este corectat ulterior pentru nivelul BEQ calculat pentru o probă-martor de matrice/solvent (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al probelor de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în	fals neconforme. Cu niveluri maxime diferite pentru PCDD-uri/PCDF-uri și pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, verificarea conformității probelor fără fracționare necesită valori-limită corespunzătoare ale biotestelor pentru PCDD-uri/PCDF-uri. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al pragului de acțiune respectiv este considerat adecvat ca valoare-limită. Dacă un nivel indicativ este exprimat în BEQ, rezultatele probelor trebuie să fie în intervalul de lucru și să depășească limita de raportare (a se vedea punctele 7.1.1 și 7.1.6). 7.1. Evaluarea răspunsului la test 7.1.1. Condiții generale — Atunci când se calculează concentrațiile pornind de la o curbă de calibrare a TCDD, valorile la extremitățile superioare ale curbei vor prezenta o variație importantă [coeficient de variație ridicat (CV)]. Intervalul de lucru este aria în care acest CV este mai mic de 15 %. Extremitatea inferioară a intervalului de lucru (limita de raportare) se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii. Extremitatea superioară a intervalului de lucru este, de obicei, reprezentată de valoarea EC₇₀ (70 % din concentrația maximă efectivă), dar mai scăzută dacă CV este mai mare de 15 % în acest interval. Intervalul de lucru se stabilește în timpul validării. Valorile-limită (a se vedea punctul 7.3) se situează în intervalul de lucru. — Soluțiile etalon și extractele de probe trebuie să fie testate în triplicat sau cel puțin în duplicat. Atunci când se utilizează duplicate, o soluție etalon sau un extract de control testată (testat) în patru până la șase godeuri repartizate pe placă trebuie să producă un răspuns sau o concentrație (posibilă doar în intervalul de lucru) pe baza unui CV < 15 %. 7.1.2. Calibrarea 7.1.2.1. Calibrarea cu curba standard	

jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 7.2. 7.1.2.2. Calibrarea cu eșantioane de referință Alternativ, poate fi utilizată o curbă de calibrare realizată pe baza a cel puțin patru eșantioane de referință (a se vedea punctul 7.2.4): poate fi utilizată un eșantion martor de matrice, plus trei eșantioane de referință de 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim sau pragul de acțiune, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și de recuperare. În acest caz, răspunsul la test echivalent cu două treimi din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare-limită. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor praguri de acțiune este considerat adecvat ca valoare-limită. 7.1.3. Determinarea separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor Extractele pot fi divizate în fracțiuni care conțin PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, permițând o indicare separată a nivelurilor TEQ pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de calibrare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor. 7.1.4. Recuperări aparente ale biotestului „Recuperarea aparentă a biotestului” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF (⁴⁰) utilizați, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente reduse pentru PCB-	— Nivelurile din probe se estimează prin compararea răspunsului la test cu o curbă de calibrare a TCDD (sau a PCB 126 sau a unui amestec etalon de PCDD/PCDF/PCB de tipul dioxinelor) pentru a se calcula nivelul BEQ din extract și, prin urmare, din probă. — Curbele de calibrare conțin între opt și 12 concentrații (cel puțin în duplicate), cu concentrații suficiente în partea inferioară a curbei (intervalul de lucru). Se acordă atenție specială calității ajustării curbei în intervalul de lucru. Ca atare, valoarea R^2 are valoare redusă sau nicio valoare în estimarea calității ajustării în regresia nelineară. Se ajunge la o ajustare mai bună prin reducerea la minimum a diferenței între nivelurile calculate și cele observate în intervalul de lucru al curbei, de exemplu prin reducerea la minimum a sumei pătratelor rezidualelor. — Nivelul estimat din extractul de probă este corectat ulterior pentru nivelul BEQ calculat pentru o probă-martor de matrice/solvent (pentru a se ține cont de impuritățile din solvenți și din substanțele chimice utilizate) și recuperarea aparentă (calculată pornind de la nivelul BEQ al probelor de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune). Pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare, recuperarea aparentă se situează în intervalul necesar (a se vedea punctul 7.1.4). Probele de referință utilizate pentru corecția în funcție de recuperare sunt în conformitate cu cerințele prevăzute la punctul 7.2. 7.1.2.2. Calibrarea cu eșantioane de referință Alternativ, poate fi utilizată o curbă de calibrare realizată pe baza a cel puțin patru eșantioane de referință (a se vedea punctul 7.2.4): poate fi utilizată un eșantion martor de matrice, plus trei eșantioane de referință de 0,5x, 1x și 2x nivelul maxim sau pragul de acțiune, eliminând necesitatea de a corecta în funcție de martor și de recuperare. În acest	

urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD-uri/PCDF-uri. Prin urmare, în cazul în care se efectuează o determinare separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale testului biologic sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 20 % și 60 %, pentru PCDD-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de calibrare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste intervale și se situează între 30 % și 130 %. Orice implicare a valorilor TEF revizuite în mod substanțial pentru legislația Uniunii pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor necesită revizuirea acestor intervale.

7.1.5. Controlul recuperărilor pentru curățare

Pierderea de compuși în timpul curățării se verifică în timpul validării. Un eșantion martor îmbogățit cu un amestec de congeneri diferiți face obiectul curățării ($n = 3$ cel puțin), iar recuperarea și variabilitatea sunt verificate printr-o metodă de confirmare. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congeneri care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri.

7.1.6. Limita de raportare

Atunci când se raportează nivelurile BEQ, se determină o limită de raportare pornind de la probele de matrice relevante care implică modele tipice pentru congeneri, dar nu pornind de la curba de calibrare a standardelor, din cauza preciziei reduse în intervalul inferior al curbei. Se iau în considerare efectele extracției și ale curățării. Limita de raportare se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii.

7.2. Utilizarea eșantioanelor de referință

7.2.1. Eșantioanele de referință reprezintă matricea de eșantionare, modelele pentru congeneri și intervalele de

caz, răspunsul la test echivalent cu două treimi din nivelul maxim (a se vedea punctul 7.3) poate fi calculat direct din aceste probe și utilizat ca valoare-limită. Pentru verificarea probelor care depășesc pragurile de acțiune, un procentaj corespunzător al acestor praguri de acțiune este considerat adecvat ca valoare-limită.

7.1.3. Determinarea separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor

Extractele pot fi divizate în fracțiuni care conțin PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, permițând o indicare separată a nivelurilor TEQ pentru PCDD/F-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor (în BEQ). Se utilizează, de preferință, o curbă de calibrare standard a PCB 126 pentru evaluarea rezultatelor fracțiunii care conține PCB-uri de tipul dioxinelor.

7.1.4. Recuperări aparente ale biotestului

„Recuperarea aparentă a biotestului” se calculează pornind de la probe de referință adecvate cu modele reprezentative pentru congeneri în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune și exprimate ca procentaj al nivelului BEQ în comparație cu nivelul TEQ. În funcție de tipul de test și de TEF ⁽⁴⁰⁾ utilizați, diferențele între factorii TEF și REP pentru PCB-urile de tipul dioxinelor pot cauza recuperări aparente reduse pentru PCB-urile de tipul dioxinelor în comparație cu PCDD-uri/PCDF-uri. Prin urmare, în cazul în care se efectuează o determinare separată a PCDD/F-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, recuperările aparente ale testului biologic sunt: pentru PCB-uri de tipul dioxinelor, între 20 % și 60 %, pentru PCDD-uri/PCDF-uri, între 50 % și 130 % (intervalele se aplică pentru curba de calibrare a TCDD). Deoarece contribuția PCB-urilor de tipul dioxinelor la suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor poate varia între diferite matrice și probe, recuperările aparente ale biotestului pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor reflectă aceste

concentrație pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. 7.2.2. În fiecare serie de teste, se includ o matrice martor și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, un eșantion martor din cadrul procedurii, precum și un eșantion de referință la nivelul maxim sau la pragul de acțiune. Aceste eșantioane se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Eșantionul de referință prezintă un răspuns cu mult mai mare în comparație cu eșantionul martor, asigurând astfel conformitatea testului. Aceste eșantioane pot fi utilizate pentru corecțiile în funcție de martor și recuperare. 7.2.3. Probele de referință alese pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare sunt reprezentative pentru probele de testare, în sensul că modelele pentru congeneri nu pot conduce la o subestimare a nivelurilor. 7.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de $0,5 \times$ și $2 \times$ nivelul maxim sau pragul de acțiune, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 7.1.2.2). 7.3. Determinarea valorilor-limită Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele în urma metodei de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de calibrare în raport cu matricea, care implică probe de referință îmbogățite la 0, 0,5x, 1x și 2x față de nivelul maxim (NM), cu șase repetări la fiecare nivel (n = 24)]. Factorii de corecție (martor și recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, însă se verifică în conformitate cu punctul 7.2.2. Valorile-limită se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul pragurilor de acțiune, în cazul în care acest lucru este	intervale și se situează între 30 % și 130 %. Orice implicare a valorilor TEF revizuite în mod substanțial pentru legislația Uniunii pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor necesită revizuirea acestor intervale. 7.1.5. Controlul recuperărilor pentru curățare Pierderea de compuși în timpul curățării se verifică în timpul validării. Un eșantion martor îmbogățit cu un amestec de congeneri diferiți face obiectul curățării (n = 3 cel puțin), iar recuperarea și variabilitatea sunt verificate printr-o metodă de confirmare. Recuperarea se situează între 60 % și 120 %, mai ales pentru congeneri care contribuie cu mai mult de 10 % la nivelul TEQ în diverse amestecuri. 7.1.6. Limita de raportare Atunci când se raportează nivelurile BEQ, se determină o limită de raportare pornind de la probele de matrice relevante care implică modele tipice pentru congeneri, dar nu pornind de la curba de calibrare a standardelor, din cauza preciziei reduse în intervalul inferior al curbei. Se iau în considerare efectele extracției și ale curățării. Limita de raportare se fixează cel puțin cu un factor de trei peste martorii procedurii. 7.2. Utilizarea eșantioanelor de referință 7.2.1. Eșantioanele de referință reprezintă matricea de eșantionare, modelele pentru congeneri și intervalele de concentrație pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor în jurul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. 7.2.2. În fiecare serie de teste, se includ o matrice martor și, în cazul în care acest lucru nu este posibil, un eșantion martor din cadrul procedurii, precum și un eșantion de referință la nivelul maxim sau la pragul de acțiune. Aceste eșantioane se supun extracției și testării în același timp și în condiții identice. Eșantionul de referință prezintă un răspuns cu mult mai mare în comparație cu eșantionul martor, asigurând	

relevant, cu nivelurile maxime sau pragul de acțiune respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Acestea sunt reprezentate prin extremitatea inferioară a distribuției rezultatelor bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) care corespund limitei de decizie a metodei de confirmare bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată a rezultatelor fals conforme < 5 %, și pe o valoare a $RSD_R < 25 \%$. Limita de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă. Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 7.3.1, 7.3.2 și 7.3.3 (a se vedea figura 1). 7.3.1. Utilizarea sectorului <i>inferior</i> al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare Valoarea limită = $BEQ_{DL} - s_{y,x} t_{\alpha,f=m-1}$ unde: BE BEQ corespunzând limitei de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă $s_{y,x}$ deviația standard reziduală $t_{\alpha,f}$ =factorul student ($\alpha = 5 \%$, $f =$ grade de libertate, asimetric) $m-2$ m numărul total de puncte de calibrare (indice j) n numărul de repetări la fiecare nivel x concentrația probei (în TEQ) a punctului de calibrare i $\bar{x}$ determinat printr-o metodă de confirmare $\bar{x}$ medie a concentrațiilor (în TEQ) ale tuturor probelor de calibrare	astfel conformitatea testului. Aceste eșantioane pot fi utilizate pentru corecțiile în funcție de martor și recuperare. 7.2.3. Probele de referință alese pentru a efectua o corecție în funcție de recuperare sunt reprezentative pentru probele de testare, în sensul că modelele pentru congeneri nu pot conduce la o subestimare a nivelurilor. 7.2.4. Se pot include probe de referință suplimentare de $0,5 \times$ și $2 \times$ nivelul maxim sau pragul de acțiune, de exemplu, pentru a se demonstra eficacitatea testului în intervalul de interes, pentru controlul nivelului maxim sau al pragului de acțiune. Combinate, aceste probe pot fi utilizate pentru calcularea nivelurilor BEQ în probele de testare (a se vedea punctul 7.1.2.2). 7.3. Determinarea valorilor-limită Se stabilește relația dintre rezultatele bioanalitice în BEQ și rezultatele în urma metodei de confirmare în TEQ [de exemplu, prin experimente de calibrare în raport cu matricea, care implică probe de referință îmbogățite la 0, 0,5x, 1x și 2x față de nivelul maxim (NM), cu șase repetări la fiecare nivel ($n = 24$)]. Factorii de corecție (martor și recuperare) pot fi estimați pornind de la această relație, însă se verifică în conformitate cu punctul 7.2.2. Valorile-limită se stabilesc pentru deciziile privind conformitatea probelor cu nivelurile maxime sau pentru controlul pragurilor de acțiune, în cazul în care acest lucru este relevant, cu nivelurile maxime sau pragul de acțiune respective stabilite fie numai pentru PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor, fie pentru suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor. Acestea sunt reprezentate prin extremitatea inferioară a distribuției rezultatelor bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) care corespund limitei de decizie a metodei de confirmare bazată pe un nivel de încredere de 95 %, ceea ce înseamnă o rată a rezultatelor fals conforme < 5 %, și pe o	

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_{1j})^2$$

parametrul sumei pătratelor, i = indice pentru punctul de calibrare i

7.3.2. Calcul pornind de la rezultatele bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) ale analizelor multiple ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

$$\text{Valoarea limită} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 \text{SD}_R$$

unde:
S deviația standard a rezultatelor biotestului la BEQ_{DL} ,
D măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

7.3.3. Calcul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectată în funcție de martor și recuperare) pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinate la punctul 7.3.1 sau la punctul 7.3.2:

Calcul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme $< 5 \%$, și pe o valoare a $\text{RSD}_R < 25 \%$:

1. pornind de la spectrul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie a metodei de confirmare.
2. pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor (reprezentată în Figură 1 printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

Figura 1

valoare a $\text{RSD}_R < 25 \%$. Limita de decizie a metodei de confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă.

Valoarea-limită (în BEQ) poate fi calculată în conformitate cu una dintre abordările descrise la punctele 7.3.1, 7.3.2 și 7.3.3 (a se vedea figura 1).

7.3.1. Utilizarea sectorului *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie aferentă metodei de confirmare

$$\text{Valoarea limită} = \text{BEQ}_{DL} - s_{y,x} t_{\alpha, f=m}$$

unde:
 BEQ_{DL} confirmare este nivelul maxim, ținând seama de incertitudinea de măsurare extinsă

$s_{y,x}$ deviația standard reziduală

$t_{\alpha, f=m}$ factorul student ($\alpha = 5 \%$, $f =$ grade de libertate, 2 asimetric)

m numărul total de puncte de calibrare (indice j)

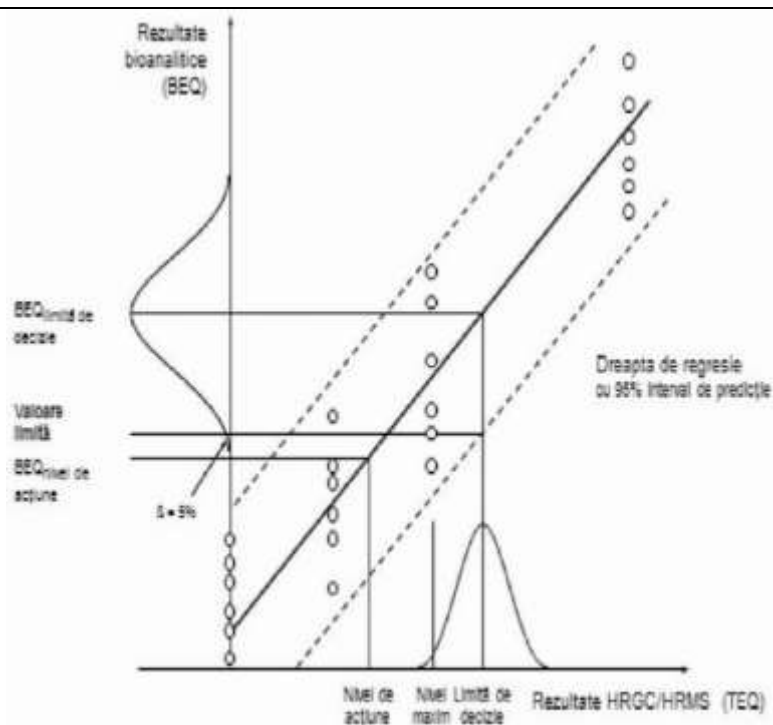
n numărul de repetări la fiecare nivel

x concentrația probei (în TEQ) a punctului de calibrare i
i determinat printr-o metodă de confirmare

$\bar{x}$ medie a concentrațiilor (în TEQ) ale tuturor probelor de calibrare

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j)^2$$

parametrul sumei pătratelor, i = indice pentru punctul de calibrare i



7.3.4. Restricții ale valorilor-limită

Valorile-limită bazate pe BEQ, calculate pornind de la valoarea RSD_R obținută în cursul validării utilizând un număr limitat de probe cu modele pentru matrice/congeneri diferite pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau pragurile de acțiune bazate pe TEQ datorită unei precizii mai mari decât cea realizabilă în analizele de rutină atunci când trebuie controlat un spectru necunoscut de posibile modele pentru congeneri. În astfel de cazuri, valorile-limită se calculează pornind de la $RSD_R = 25\%$ sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune.

7.4. Caracteristici de performanță

7.3.2. Calcul pornind de la rezultatele bioanalitice (corectate în funcție de martor și recuperare) ale analizelor multiple ale probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare, ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor la valoarea medie BEQ corespunzătoare:

$$\text{Valoarea limită} = BEQ_{DL} - 1,64 SD_R$$

unde:

S deviația standard a rezultatelor biotestului la BEQ_{DL} , D_R măsurată în condiții de reproductibilitate intralaborator

7.3.3. Calcul ca valoare medie a rezultatelor bioanalitice (în BEQ, corectată în funcție de martor și recuperare) pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune, având drept bază observația că acest nivel va fi în jurul valorii-limită determinate la punctul 7.3.1 sau la punctul 7.3.2:

Calcul al valorilor-limită, bazat pe un nivel de încredere de 95 %, implicând o rată a rezultatelor fals conforme $< 5\%$, și pe o valoare a $RSD_R < 25\%$:

1. pornind de la spectrul *inferior* al intervalului de predicție de 95 % la limita de decizie a metodei de confirmare.
2. pornind de la analiza multiplă a probelor ($n \geq 6$) contaminate la limita de decizie a metodei de confirmare ca extremitate *inferioară* a distribuției datelor (reprezentată în Figură 1 printr-o curbă sub formă de clopot) la valoarea medie BEQ corespunzătoare.

Figura 1

7.4.1. Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, testele cu privire la repetabilitatea metodelor bioanalitice se efectuează pentru obținerea unor informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste și între serii de teste. Repetabilitatea trebuie să fie sub 20 %, iar reproductibilitatea intralaborator sub 25 %. Aceasta se bazează pe nivelurile calculate în BEQ după corecția în funcție de martor și recuperare.

7.4.2. Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită stabilirea diferenței între o probă-martor și un nivel la valoarea-limită, permițând identificarea probelor peste valoarea-limită corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2).

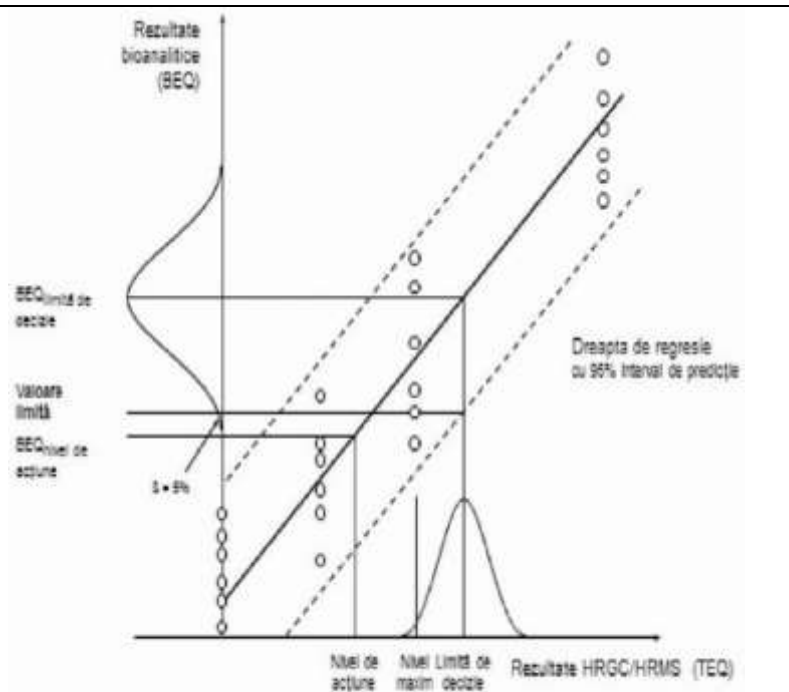
7.4.3. Se definesc compușii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului.

7.4.4. Deviația standard procentuală a răspunsului sau a concentrației calculate pornind de la răspuns (posibilă numai în intervalul de lucru) a unei determinări triple a unui extract de probă nu poate fi mai mare de 15 %.

7.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimată (exprimate) în BEQ (martor și nivelul maxim sau pragul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă.

7.4.6. Graficele de control al calității pentru martorii procedurii și fiecare tip de probă de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că performanța analitică este în conformitate cu cerințele, în special pentru martorii procedurii cu privire la diferența minimă solicitată la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Martorii procedurii sunt controlați într-un mod care să evite rezultatele fals conforme atunci când se scad.

7.4.7. Rezultatele metodelor de confirmare ale probelor suspectate și a 2-10 % din probele conforme (minimum 20 de probe pentru fiecare matrice) sunt colectate și folosite pentru a



7.3.4. Restricții ale valorilor-limită

Valorile-limită bazate pe BEQ, calculate pornind de la valoarea RSD_R obținută în cursul validării utilizând un număr limitat de probe cu modele pentru matrice/congeneri diferite pot fi mai mari decât nivelurile maxime sau pragurile de acțiune bazate pe TEQ datorită unei precizii mai mari decât cea realizabilă în analizele de rutină atunci când trebuie controlat un spectru necunoscut de posibile modele pentru congeneri. În astfel de cazuri, valorile-limită se calculează pornind de la $RSD_R = 25\%$ sau se preferă două treimi din nivelul maxim sau pragul de acțiune.

7.4. *Caracteristici de performanță*

evalua performanța metodei de screening și relația între BEQ și TEQ. Această bază de date poate fi utilizată pentru reevaluarea valorilor-limită aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate. 7.4.8. Buna performanță a metodelor poate fi, de asemenea, demonstrată prin participarea la testările interlaboratoare. Rezultatele probelor analizate în testările interlaboratoare, care acoperă un interval de concentrații care să ajungă până la, de exemplu, 2x nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei rezultatelor fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse. 7.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident. 8. Raportarea rezultatelor 8.1. <i>Metode de confirmare</i> 8.1.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și sunt raportate ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințe specifice. 8.1.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere. 8.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele	7.4.1. Având în vedere faptul că nu se pot utiliza etaloane interne în metodele bioanalitice, testele cu privire la repetabilitatea metodelor bioanalitice se efectuează pentru obținerea unor informații privind deviația standard în cadrul unei serii de teste și între serii de teste. Repetabilitatea trebuie să fie sub 20 %, iar reproductibilitatea intralaborator sub 25 %. Aceasta se bazează pe nivelurile calculate în BEQ după corecția în funcție de martor și recuperare. 7.4.2. Ca parte din procesul de validare, testul trebuie să permită stabilirea diferenței între o probă-martor și un nivel la valoarea-limită, permițând identificarea probelor peste valoarea-limită corespunzătoare (a se vedea punctul 7.1.2). 7.4.3. Se definesc compuşii-țintă, interferențele potențiale și nivelurile maxime tolerabile ale martorului. 7.4.4. Deviația standard procentuală a răspunsului sau a concentrației calculate pornind de la răspuns (posibilă numai în intervalul de lucru) a unei determinări triple a unui extract de probă nu poate fi mai mare de 15 %. 7.4.5. Rezultatele necorectate ale probei (probelor) de referință exprimată (exprimate) în BEQ (martor și nivelul maxim sau pragul de acțiune) sunt utilizate pentru evaluarea performanței metodei bioanalitice pe o perioadă de timp constantă. 7.4.6. Graficele de control al calității pentru martorii procedurii și fiecare tip de probă de referință se înregistrează și se verifică pentru a se garanta că performanța analitică este în conformitate cu cerințele, în special pentru martorii procedurii cu privire la diferența minimă solicitată la limita inferioară a intervalului de lucru și pentru probele de referință cu privire la reproductibilitatea intralaborator. Martorii procedurii sunt controlați într-un mod care să evite rezultatele fals conforme atunci când se scad. 7.4.7. Rezultatele metodelor de confirmare ale probelor suspectate și a 2-10 % din probele conforme (minimum 20	

analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, se utilizează suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.1.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE. 8.2. Metode bioanalitice de screening 8.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”). 8.2.2. În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu în TEQ. 8.2.3. Probele cu un răspuns inferior limitei de raportare se exprimă ca fiind „sub limita de raportare”. Rezultatul probelor cu un răspuns peste intervalul de lucru se raportează ca „depășind intervalul de lucru”, iar nivelul corespunzător extremității superioare a intervalului de lucru se furnizează în BEQ. 8.2.4. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea. 8.2.5. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de calibrare. 8.2.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.2.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma	de probe pentru fiecare matrice) sunt colectate și folosite pentru a evalua performanța metodei de screening și relația între BEQ și TEQ. Această bază de date poate fi utilizată pentru reevaluarea valorilor-limită aplicabile probelor de rutină pentru matricele validate. 7.4.8. Buna performanță a metodelor poate fi, de asemenea, demonstrată prin participarea la testările interlaboratoare. Rezultatele probelor analizate în testările interlaboratoare, care acoperă un interval de concentrații care să ajungă până la, de exemplu, 2x nivelul maxim, pot fi incluse în evaluarea ratei rezultatelor fals conforme, în cazul în care un laborator este în măsură să demonstreze buna sa performanță. Probele acoperă cele mai frecvente modele pentru congeneri, reprezentând diverse surse. 7.4.9. În timpul incidentelor, valorile-limită pot fi reevaluate, reflectând matricea specifică și modelele pentru congeneri doar ale acestui incident. 8. Raportarea rezultatelor 8.1. Metode de confirmare 8.1.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și sunt raportate ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințe specifice. 8.1.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.1.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.	

de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare. 8.2.8. Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare. 8.3. Metode fizico-chimice de screening 8.3.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”). 8.3.2. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea. 8.3.3. În plus, nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și/sau ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ se pot furniza ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE. 8.3.4. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere. 8.3.5. Raportul trebuie să menționeze metoda GC-MS utilizată. 8.3.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.3.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare. 8.3.8. Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare.	8.1.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. În cazul unei determinări separate a PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor, se utilizează suma incertitudinii extinse estimate a rezultatelor analitice separate ale PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor pentru suma PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.1.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020. 8.2. Metode bioanalitice de screening 8.2.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”). 8.2.2. În plus, se poate da un rezultat indicativ pentru PCDD-uri/PCDF-uri și/sau PCB-uri de tipul dioxinelor exprimat în BEQ, și nu în TEQ. 8.2.3. Probele cu un răspuns inferior limitei de raportare se exprimă ca fiind „sub limita de raportare”. Rezultatul probelor cu un răspuns peste intervalul de lucru se raportează ca „depășind intervalul de lucru”, iar nivelul corespunzător extremității superioare a intervalului de lucru se furnizează în BEQ. 8.2.4. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea. 8.2.5. Raportul menționează tipul de test aplicat, principiul de bază al testului și tipul de calibrare.	

CAPITOLUL III

PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE

1. Domeniu de aplicare

Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de bifenili policlorurați care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor), precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Regulamentul (CE) nr. 183/2005.

2. Metode de detectare aplicabile

Gaz-cromatografie/detectare prin captură de electroni (GC-CDE), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS sau metode echivalente.

3. Identificarea și confirmarea analiților de interes

3.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă +/- 0,25 %).

3.2. Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri co-eluate, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să se confirme ([41](#)).

3.3. Cerințe pentru tehnici GC-MS

Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:

(a) doi ioni specifici pentru HRMS;

(b) trei ioni specifici pentru LRMS;

(c) doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs pentru MS-MS.

Toleranțele maxime admisibile pentru raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate:

8.2.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor.

8.2.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare.

8.2.8. Rezultatele neconforme se raportează numai în urma analizei de confirmare.

8.3. Metode fizico-chimice de screening

8.3.1. Rezultatul screeningului se exprimă ca și „conform” sau „suspectat a fi neconform” („suspectat”).

8.3.2. Pentru fiecare tip de matrice a probei, raportul menționează nivelul maxim sau pragul de acțiune pe care se bazează evaluarea.

8.3.3. În plus, nivelurile de congeneri individuali ai PCDD/F-urilor și/sau ai PCB-urilor de tipul dioxinelor și valorile TEQ se pot furniza ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020.

8.3.4. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 6.2.5, dacă se depășește nivelul maxim (în acest caz, recuperările pentru una din cele două analize duplicat), iar în celelalte cazuri, la cerere.

8.3.5. Raportul trebuie să menționeze metoda GC-MS utilizată.

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a abundenței izotopice sau standardul de calibrare pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) calificativ(i): $\pm 15 \%$. 3.4. Cerințe pentru tehnici GC-ECD Rezultatele care depășesc nivelul maxim sunt confirmate cu două coloane de GC cu faze staționare de polaritate diferită. 4. Demonstrarea randamentului metodei Randamentul metodei se validează în intervalul nivelului maxim (0,5 la 2 x nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 9). 5. Limita de cuantificare Suma limitelor de cuantificare (LOQ) (⁴²) ale PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim (⁴³). 6. Controlul calității Controale ale matorului, analiză a probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante, la intervale regulate. 7. Controlul recuperărilor 7.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes. 7.2. Adăugarea de etaloane interne: adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare). 7.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop: (a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne; (b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;	8.3.6. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCDD-urilor/PCDF-urilor și a PCB-urilor de tipul dioxinelor. 8.3.7. În cazul probelor suspectate a fi neconforme, raportul trebuie să includă o notă privind măsurile care urmează a fi adoptate. Concentrația de PCDD-uri/PCDF-uri și suma de PCDD-uri/PCDF-uri și PCB-uri de tipul dioxinelor din acele probe cu niveluri ridicate trebuie determinată/confirmată printr-o metodă de confirmare. 8.3.8. Neconformitatea poate fi decisă numai în urma analizei de confirmare. CAPITOLUL III <i>PREGĂTIREA PROBELOR ȘI CERINȚE PRIVIND METODELE DE ANALIZĂ UTILIZATE PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL NIVELURILOR DE PCB-URI CARE NU SUNT DE TIPUL DIOXINELOR DIN FURAJE</i> 1. Domeniu de aplicare Cerințele stabilite în prezentul capitol se aplică atunci când furajele sunt analizate pentru controlul oficial al nivelurilor de bifenili policlorurați care nu sunt de tipul dioxinelor (PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor), precum și în ceea ce privește pregătirea probelor și cerințele analitice pentru alte scopuri de reglementare, care includ controalele oficiale efectuate de operatorii din sectorul hranei pentru animale pentru a asigura conformitatea cu Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020. 2. Metode de detectare aplicabile Gaz-cromatografie/detectare prin captură de electroni (GC-CDE), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS sau metode echivalente. 3. Identificarea și confirmarea analiților de interes	

(c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10 % sunt acceptabile.

7.4. Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:

(a) recuperarea etalonului (etalanelor) intern(e) se controlează pentru fiecare probă;

(b) recuperările etalonului (etalanelor) intern(e) sunt între 60 % și 120 %;

(c) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etalanelor interne.

7.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 60 și 120 %.

8. Cerințe pentru laboratoare

În conformitate cu dispozițiile Regulamentului (UE) 2017/625, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului EN ISO/IEC 17025. În plus, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCB-urilor (⁴⁴).

9. Caracteristici de performanță: criterii pentru suma celor șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor la nivelul maxim

	Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor ^(*)	Alte tehnici

3.1. Timpul de retenție relativ în raport cu etaloanele interne sau etaloanele de referință (deviație acceptabilă +/- 0,25 %).

3.2. Separarea gaz-cromatografică a PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor de substanțele interferente, în special PCB-uri co-eluate, mai ales în cazul în care nivelurile probelor sunt în limite legale și neconformitatea trebuie să se confirme (⁴¹).

3.3. Cerințe pentru tehnici GC-MS

Monitorizarea cel puțin a următorului număr de ioni moleculari sau de ioni caracteristici din clusterul molecular:

(a) doi ioni specifici pentru HRMS;

(b) trei ioni specifici pentru LRMS;

(c) doi ioni precursori specifici, fiecăruia corespunzându-i un anumit ion produs pentru MS-MS.

Toleranțele maxime admisibile pentru raportul valorilor izotopilor pentru fragmentele de masă selecționate:

Deviația relativă a abundenței izotopice relative pentru fragmentele de masă selecționate și valoarea teoretică a abundenței izotopice sau standardul de calibrare pentru ionul țintă (ionul monitorizat cu cea mai ridicată abundență izotopică) și ionul (ionii) calificativ(i): ± 15 %.

3.4. Cerințe pentru tehnici GC-ECD

Rezultatele care depășesc nivelul maxim sunt confirmate cu două coloane de GC cu faze staționare de polaritate diferită.

4. Demonstrarea randamentului metodei

Randamentul metodei se validează în intervalul nivelului maxim (0,5 la 2 x nivelul maxim), cu un coeficient de variație acceptabil pentru analiza repetată (a se vedea cerințele pentru precizia intermediară de la punctul 9).

5. Limita de cuantificare

Suma limitelor de cuantificare (LOQ) (⁴²) ale PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor nu trebuie să fie mai mare de o treime din nivelul maxim (⁴³).

6. Controlul calității

Autenticitate	între -20 % și 20 %	între -30 % și 30 %	Controale ale matorului, analiză a probelor îmbogățite, probe pentru controlul calității, participarea la studii interlaboratoare pe matrice relevante, la intervale regulate.		
Precizie intermediară (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %	7. Controlul recuperărilor		
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %	7.1. Se utilizează etaloane interne adecvate cu proprietăți fizico-chimice comparabile cu cele ale analiților de interes.		
(*1) Utilizarea tuturor celor șase analogi marcați ¹³ C, conform standardelor interne.			7.2. Adăugarea de etaloane interne: adăugare la produse (înaintea procesului de extracție și de curățare).		
10. Raportarea rezultatelor			7.3. Cerințe privind metodele care utilizează toți cei șase congeneri ai PCB-urilor care nu sunt de tipul dioxinelor marcați cu un izotop:		
10.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor individuali care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor congeneri raportați ca estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice.			(a) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne;		
10.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor.			(b) recuperările etaloanelor interne marcate cu un izotop sunt între 60 și 120 %;		
10.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere.			(c) recuperările inferioare sau superioare pentru congenerii individuali cu o contribuție la suma de șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor mai mică de 10 % sunt acceptabile.		
10.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus și el la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca x +/- U, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %.			7.4. Cerințe privind metodele care nu utilizează toate cele șase etaloane interne marcate cu un izotop sau alte etaloane interne:		
			(a) recuperarea etalonului (etalanelor) intern(e) se controlează pentru fiecare probă;		
			(b) recuperările etalonului (etalanelor) intern(e) sunt între 60 % și 120 %;		
			(c) rezultatele sunt corectate pentru recuperările etaloanelor interne.		
			7.5. Recuperările congenerilor nemarcați se verifică prin probe îmbogățite sau probe pentru controlul calității cu concentrații în intervalul nivelului maxim. Recuperările acestor congeneri se consideră acceptabile, în cazul în care sunt între 60 și 120 %.		
			8. Cerințe pentru laboratoare		

10.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute de Directiva 2002/32/CE. B. STANDARDE EN Pentru aplicarea articolului 34 alineatul (2) litera (a) din Regulamentul (UE) 2017/625, sunt relevante următoarele standarde EN: EN 17194: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea deoxinivalenolului, aflatoxinei B1, fumonisinei B1 și B2, T-2 și H-2, a zearalenonei și ochratoxinei A în materiile prime furajere și în furajele combinate prin LC-MS/MS EN 17270: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea teobrominei din materiile prime furajere și din furajele combinate, inclusiv ingredientele derivate din cacao, prin cromatografie lichidă EN 17504 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză. Determinarea gosipolului din semințele de bumbac și furaje prin LC-MS/MS EN 17362 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea pentaclorfenolului (PCP) în materiile prime furajere și în furajele combinate prin LCMS/MS EN 16279: Hrană pentru animale – Determinarea conținutului de fluorură după tratamentul cu acid clorhidric prin metoda electrozilor sensibili la ioni (ISE) EN 17053: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele și a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă) EN 15550 Hrană pentru animale – Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea cadmiului și a plumbului prin spectrometrie de absorbție atomică în cuptorul cu grafit (GF-AAS) după dizolvare sub presiune EN 16206 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri	În conformitate cu dispozițiile Legii 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, laboratoarele sunt acreditate de un organism recunoscut care funcționează în conformitate cu Ghidul SM ISO/IEC 58, pentru a se asigura aplicarea de către acestea a procedurilor de asigurare a calității analizelor. Laboratoarele sunt acreditate conform standardului SM EN ISO/IEC 17025:2018. În plus, trebuie respectate principiile descrise în Orientările tehnice pentru estimarea incertitudinii de măsurare și a limitelor de cuantificare pentru analiza PCB-urilor (44). 9. Caracteristici de performanță: criterii pentru suma celor șase PCB-uri care nu sunt de tipul dioxinelor la nivelul maxim <table border="1"> <thead> <tr> <th></th><th>Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor (*1)</th><th>Alte tehnici</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Autenticitate</td><td>între -20 % și 20 %</td><td>între -30 % și 30 %</td></tr> <tr> <td>Precizie intermediară (RSD %)</td><td>≤ 15 %</td><td>≤ 20 %</td></tr> <tr> <td>Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului</td><td>≤ 20 %</td><td>≤ 20 %</td></tr> </tbody> </table> (*1) Utilizarea tuturor celor șase analogi marcați ¹³C, conform standardelor interne. 10. Raportarea rezultatelor 10.1. Rezultatele analitice includ nivelurile de congeneri individuali ai PCB-urilor individuali care nu sunt de tipul dioxinelor și suma PCB-urilor congeneri raportați ca		Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor (*1)	Alte tehnici	Autenticitate	între -20 % și 20 %	între -30 % și 30 %	Precizie intermediară (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %	Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %	
	Spectrometrie de masă prin metoda de diluție a izotopilor (*1)	Alte tehnici												
Autenticitate	între -20 % și 20 %	între -30 % și 30 %												
Precizie intermediară (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %												
Diferența dintre estimarea superioară și estimarea inferioară a calculului	≤ 20 %	≤ 20 %												

(HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen) EN 16277 Hrană pentru animale – Determinarea mercurului prin spectrometrie de absorbție atomică cu vapori reci (CVAAS) după dizolvarea cu microunde (extracție cu 65 % acid azotic și 30 % peroxid de hidrogen) EN 16278 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului anorganic prin spectrometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (HG-AAS) după extracție cu microunde și separarea prin extracție în fază solidă (SPE) EN 17374 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea arsenului anorganic din furaje prin HPLC-ICP-MS cu schimbător de anioni. ▼M2	estimare inferioară, estimare superioară și estimare mediană, pentru a include o cantitate maximă de informații în raportarea rezultatelor, ceea ce permite o interpretare a rezultatelor în conformitate cu cerințele specifice. 10.2. Raportul include metoda utilizată pentru extracția PCB-urilor. 10.3. Recuperările etaloanelor interne individuale sunt disponibile dacă recuperările se situează în afara intervalului menționat la punctul 7, dacă se depășește nivelul maxim, iar în celelalte cazuri, la cerere. 10.4. Întrucât, atunci când se decide conformitatea unei probe, se ține seama de incertitudinea de măsurare extinsă, acest parametru trebuie pus și el la dispoziție. De aceea, rezultatele analitice se raportează ca $x \pm U$, unde x este rezultatul analitic și U este incertitudinea de măsurare extinsă, folosind un factor de acoperire 2, care dă un nivel de încredere de aproximativ 95 %. 10.5. Rezultatele se exprimă în aceleași unități și prin cel puțin același număr de zecimale precum nivelurile maxime prevăzute la Cerințele sanitar-veterinare față de hrana pentru animale, aprobate prin Hotărârea Guvernului nr.910/2020. B. STANDARDE SM EN Pentru aplicarea art. 32 alin.(2) lit. a) din Legea 82/2024 privind controalele oficiale în domeniul agroalimentar, sunt relevante următoarele standarde SM EN: SM EN 17194:2020: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea deoxinivalenolului, aflatoxinei B1, fumonisinei B1 și B2, T-2 și H-2, a zearalenonei și ochratoxinei A în materiile prime furajere și în furajele combinate prin LC-MS/MS SM EN 17270:2020: Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – Determinarea teobrominei din materiile prime furajere și din furajele combinate, inclusiv ingredientele derivate din cacao, prin cromatografie lichidă	

	SM EN 17504:2022 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză. Determinarea gosipolului din seminţele de bumbac şi furaje prin LC-MS/MS SM EN 17362:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea pentaclorfenolului (PCP) în materiile prime furajere şi în furajele combinate prin LCMS/MS SM EN 16279:2017: Hrană pentru animale – Determinarea conţinutului de fluorură după tratamentul cu acid clorhidric prin metoda electrozilor sensibili la ioni (ISE) SM EN 17053:2018: Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea oligoelementelor, a metalelor grele şi a altor elemente din furaje prin ICP-MS (multimetodă) SM EN 15550:2018 Hrană pentru animale – Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea cadmiului şi a plumbului prin spectrometrie de absorbţie atomică în cuptorul cu grafit (GF-AAS) după dizolvare sub presiune SM EN 16206:2017 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului prin spectrometrie de absorbţie atomică cu generare de hidruri (HGAAS) după dizolvarea cu microunde (dizolvare cu 65 % acid azotic şi 30 % peroxid de hidrogen) SM EN 16277:2017 Hrană pentru animale – Determinarea mercurului prin spectrometrie de absorbţie atomică cu vapori reci (CVAAS) după dizolvarea cu microunde (extracţie cu 65 % acid azotic şi 30 % peroxid de hidrogen) SM EN 16278:2017 Hrană pentru animale – Determinarea arsenului anorganic prin spectrometrie de absorbţie atomică cu generare de hidruri (HG-AAS) după extracţie cu microunde şi separarea prin extracţie în fază solidă (SPE) SM EN 17374:2020 Hrană pentru animale: Metode de eşantionare şi de analiză – Determinarea arsenului anorganic din furaje prin HPLC-ICP-MS cu schimbător de anioni.		

ANEXA VI METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA CONSTITUENȚILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL FURAJELOR ▼M8 1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE Determinarea constituenților de origine animală în hrana pentru animale se efectuează prin microscopie optică sau reacție în lanț a polimerazei (PCR), în conformitate cu dispozițiile stabilite în prezenta anexă. Aceste două metode fac posibilă depistarea prezenței constituenților de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Totuși, ele nu fac posibilă calcularea cantității acestor constituenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Ambele metode au o limită de detecție sub 0,1 % (G/G). Metoda PCR face posibilă identificarea grupului taxonomic al constituenților de origine animală prezenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Aceste metode se aplică pentru controlul aplicării interdicțiilor prevăzute la articolul 7 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 999/2001 al Parlamentului European și al Consiliului (⁴⁵), în anexa IV la regulamentul respectiv și la articolul 11 alineatul (1) din Regulamentul (CE) nr. 1069/2009 al Parlamentului European și al Consiliului (⁴⁶). În funcție de tipul de hrană pentru animale testată, aceste metode pot fi utilizate, în cadrul unui singur protocol operațional, fie singure, fie combinate, în conformitate cu procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de referință al UE pentru depistarea proteinelor animale în hrana pentru animale (EURL-AP) și publicate pe site-ul său de internet (⁴⁷).	Anexă nr.6 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor METODE DE ANALIZĂ PENTRU DETERMINAREA CONSTITUENȚILOR DE ORIGINE ANIMALĂ PENTRU CONTROLUL OFICIAL AL FURAJELOR 1. SCOP ȘI DOMENIU DE APLICARE Determinarea constituenților de origine animală în hrana pentru animale se efectuează prin microscopie optică sau reacție în lanț a polimerazei (PCR), în conformitate cu dispozițiile stabilite în prezenta anexă. Aceste două metode fac posibilă depistarea prezenței constituenților de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Totuși, ele nu fac posibilă calcularea cantității acestor constituenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Ambele metode au o limită de detecție sub 0,1 % (G/G). Metoda PCR face posibilă identificarea grupului taxonomic al constituenților de origine animală prezenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Aceste metode se aplică pentru controlul aplicării interdicțiilor prevăzute la pct.31din Normei privind stabilirea unor măsuri pentru prevenirea, controlul și eradicarea anumitor forme transmisibile de encefalopatie spongiformă conform Hotărârii Guvernului nr. 713/2024 și în anexa nr.3 la hotărârea respectivă și la art. 11 alin. (1) la Legea nr. 129/2019 privind subprodusele de origine animală și produsele derivate care nu sunt destinate consumului uman .	Compatibil	

▼M2

2. METODE

▼M8

2.1. Microscopie optică

2.1.1. Principiu

Constituenții de origine animală care pot fi prezenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, trimise spre analizare, sunt identificați pe baza caracteristicilor tipice și identificabile microscopic, cum ar fi fibrele musculare și alte particule de carne, cartilajul, oasele, coarnele, părul, părul de porc, fragmentele cuticulare ale nevertebratelor, structurile traheale ale insectelor, produsele de sânge, globule din lapte, cristalele de lactoză, penele, cojile de ouă, oasele și solzii de pește.

Examinările microscopice se efectuează după prepararea eşantioanelor prin sedimentare.

Eşantioanele se supun unei etape de sedimentare, după cum urmează:

(a) pentru depistarea constituenților de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, o singură etapă de sedimentare cu tetracloretilenă (TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.3;

(b) pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, o etapă dublă de sedimentare cu eter de petrol/tetracloretilenă (PE/TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.4.

2.1.2. Reactivi și echipamente

2.1.2.1. Reactivi

2.1.2.1.1. Agent de concentrare

— Tetracloretilenă (greutate specifică 1,62).

— Eter de petrol (PE) punct de fierbere 40-60 °C (greutate specifică 0,65).

2.1.2.1.2. Agent de colorare

În funcție de tipul de hrană pentru animale testată, aceste metode pot fi utilizate, în cadrul unui singur protocol operațional, fie singure, fie combinate, în conformitate cu procedurile standard de operare (PSO) stabilite de laboratorul de referință al UE pentru depistarea proteinelor animale în hrana pentru animale (EURL-AP) și publicate pe site-ul său de internet ([47](#)).

2. METODE

2.1. Microscopie optică

2.1.1. Principiu

Constituenții de origine animală care pot fi prezenți în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, trimise spre analizare, sunt identificați pe baza caracteristicilor tipice și identificabile microscopic, cum ar fi fibrele musculare și alte particule de carne, cartilajul, oasele, coarnele, părul, părul de porc, fragmentele cuticulare ale nevertebratelor, structurile traheale ale insectelor, produsele de sânge, globule din lapte, cristalele de lactoză, penele, cojile de ouă, oasele și solzii de pește.

Examinările microscopice se efectuează după prepararea eşantioanelor prin sedimentare.

Eşantioanele se supun unei etape de sedimentare, după cum urmează:

(a) pentru depistarea constituenților de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, o singură etapă de sedimentare cu tetracloretilenă (TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.3;

(b) pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, o etapă dublă de sedimentare cu eter de petrol/tetracloretilenă (PE/TCE), astfel cum se detaliază la punctul 2.1.3.4.4.

2.1.2. Reactivi și echipamente

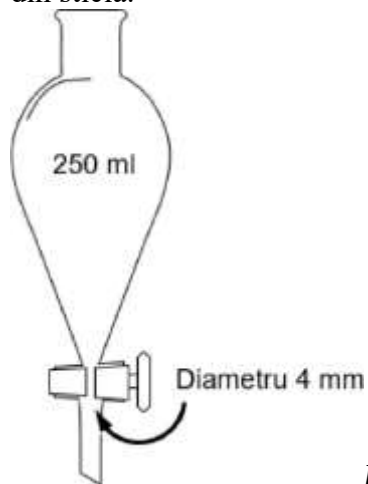
2.1.2.1. Reactivi

— Soluție de roșu de alizarină (se diluează 2,5 ml acid clorhidric 1M în 100 ml apă și se adaugă 200 mg roșu de alizarină în soluția obținută). 2.1.2.1.3. Medii de montare — Leșie (NaOH 2,5 % G/V sau KOH 2,5 % G/V). — Glicerol (nediluat, vâscozitate: 1 490 cP) sau un mediu de montare cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente. — Adeziv Norland ® Optical 65 (vâscozitate: 1 200 cP) sau o rășină cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente. 2.1.2.1.4. Mediu de montare cu proprietăți de colorare — Soluție Lugol (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent). — Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml apă). — Reactiv Fehling [preparat înainte de utilizare din părți egale (1/1) de soluții bistoc A și B: soluția A [se dizolvă 6,9 g de sulfat de cupru (II) pentahidrat în 100 ml apă]; soluția B (se dizolvă 34,6 g de tartrat de potasiu și sodiu tetrahidrat și 12 g NaOH în 100 ml apă). — Tetrametilbenzidină/peroxid de hidrogen [se dizolvă 1 g de 3,3', 5,5' tetrametilbenzidină (TMB) în 100 ml acid acetic glacial și 150 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă patru părți din această soluție TMB cu o parte de soluție de peroxid de hidrogen 3 %]. 2.1.2.1.5. Agenți de limpezire — Etanol ≥ 96 % (puritate tehnică). — Acetonă (puritate tehnică). 2.1.2.1.6. Agent de decolorare — Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9-14 % clor activ). 2.1.2.2. „Echipamente — Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g.	2.1.2.1.1. Agent de concentrare — Tetracloretilenă (greutate specifică 1,62). — Eter de petrol (PE) punct de fierbere 40-60 °C (greutate specifică 0,65). 2.1.2.1.2. Agent de colorare — Soluție de roșu de alizarină (se diluează 2,5 ml acid clorhidric 1M în 100 ml apă și se adaugă 200 mg roșu de alizarină în soluția obținută). 2.1.2.1.3. Medii de montare — Leșie (NaOH 2,5 % G/V sau KOH 2,5 % G/V). — Glicerol (nediluat, vâscozitate: 1 490 cP) sau un mediu de montare cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente. — Adeziv Norland ® Optical 65 (vâscozitate: 1 200 cP) sau o rășină cu proprietăți echivalente pentru prepararea lamelor nepermanente. 2.1.2.1.4. Mediu de montare cu proprietăți de colorare— Soluție Lugol (se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 100 ml apă și se adaugă 1 g de iod agitând frecvent). — Reactiv cistină (2 g acetat de plumb, 10 g NaOH/100 ml apă). — Reactiv Fehling [preparat înainte de utilizare din părți egale (1/1) de soluții bistoc A și B: soluția A [se dizolvă 6,9 g de sulfat de cupru (II) pentahidrat în 100 ml apă]; soluția B (se dizolvă 34,6 g de tartrat de potasiu și sodiu tetrahidrat și 12 g NaOH în 100 ml apă). — Tetrametilbenzidină/peroxid de hidrogen [se dizolvă 1 g de 3,3', 5,5' tetrametilbenzidină (TMB) în 100 ml acid acetic glacial și 150 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă patru părți din această soluție TMB cu o parte de soluție de peroxid de hidrogen 3 %]. 2.1.2.1.5. Agenți de limpezire — Etanol ≥ 96 % (puritate tehnică).	

— Echipament de măcinare: moară cu cuțite sau cu rotor. Dacă este utilizată o moară cu rotor, sitele $\leq 0,5$ mm sunt interzise.

— Sitele cu ochiuri pătrate de 0,25 mm și 1 mm lățime. Cu excepția cernerii în prealabil a eșantioanelor, diametrul sitelor trebuie să nu depășească 10 cm pentru a evita pierderea de materiale. Nu este necesară calibrarea sitelor.

— Pâlnie de separare conică din sticlă cu un conținut de 250 ml cu robinet din teflon sau din sticlă șlefuită la baza conului. Diametrul de deschidere al robinetului trebuie să fie ≥ 4 mm. De asemenea, pentru etapa de sedimentare doar cu TCE, se poate folosi un pahar de sedimentare conic, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat că nivelurile de detecție sunt echivalente cu cele obținute utilizând pâlnia de separare conică din sticlă.



Pâlnie de separare

— Microscop stereoscopic care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 6,5 x-40 x.

— Microscop compus care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 100 x-400 x, cu câmp luminos cu lumină transmisă. Se pot utiliza, în plus, lumină polarizată, contrast interferențial diferențial.

— Acetonă (puritate tehnică).

2.1.2.1.6. **Agent de decolorare**

— Soluție comercială de hipoclorit de sodiu (9-14 % clor activ).

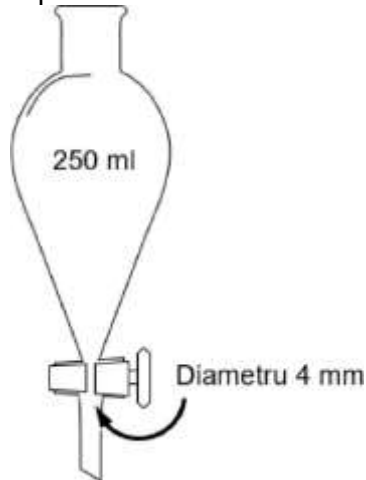
2.1.2.2. **„Echipamente**

—Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g.

— Echipament de măcinare: moară cu cuțite sau cu rotor. Dacă este utilizată o moară cu rotor, sitele $\leq 0,5$ mm sunt interzise.

— Sitele cu ochiuri pătrate de 0,25 mm și 1 mm lățime. Cu excepția cernerii în prealabil a eșantioanelor, diametrul sitelor trebuie să nu depășească 10 cm pentru a evita pierderea de materiale. Nu este necesară calibrarea sitelor.

—Pâlnie de separare conică din sticlă cu un conținut de 250 ml cu robinet din teflon sau din sticlă șlefuită la baza conului. Diametrul de deschidere al robinetului trebuie să fie ≥ 4 mm. De asemenea, pentru etapa de sedimentare doar cu TCE, se poate folosi un pahar de sedimentare conic, cu condiția ca laboratorul să fi demonstrat că nivelurile de detecție sunt echivalente cu cele obținute utilizând pâlnia de separare conică din sticlă.



— Sticlărie de laborator standard. — Echipamente pentru prepararea lamelor: lame de microscop clasice, lame tubulare, lamele (20 × 20 mm), pensete, spatulă fină. — Cuptor de laborator. — Centrifugă. — Filtru de hârtie: filtru din celuloză de calitate (dimensiunea porilor 4-11 μm). 2.1.3. Eșantionarea și prepararea eșantioanelor 2.1.3.1. Eșantionare Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu anexa I. 2.1.3.1.1. Uscarea eșantioanelor Eșantioanele cu un conținut de umiditate > 14 % se usucă înainte de manipulare în conformitate cu anexa III. 2.1.3.1.2. Cernerea în prealabil a eșantioanelor Pentru a colecta informații privind posibila contaminare ambientală a hranei destinate animalelor, se recomandă să se cearnă în prealabil la dimensiunea de 1 mm hrana sub formă de pelete și grăunțe și apoi să se prepare, să se analizeze și să se raporteze separat cele două fracțiuni rezultate, care trebuie să fie considerate ca eșantioane distincte. 2.1.3.2. Măsuri de precauție Pentru a se evita contaminarea încrucișată în laborator, toate echipamentele reutilizabile se curăță cu grijă înainte de utilizare. Piesele pâlniei de separare se demontează înainte de curățare. Piesele pâlniei de separare și sticlăria se prespală manual și apoi se spală într-o mașină de spălat. Sitele se curăță utilizând o perie cu peri sintetici aspri. Se recomandă curățarea finală a sitelor cu acetonă și aer comprimat după cernerea materiilor grase, precum făina de pește. 2.1.3.3. Prepararea eșantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri	<i>Pâlnie de separare</i> — Microscop stereoscopic care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 6,5 x-40 x. — Microscop compus care acoperă un interval de amplificare finală de cel puțin 100 x-400 x, cu câmp luminos cu lumină transmisă. Se pot utiliza, în plus, lumină polarizată, contrast interferențial diferențial. — Sticlărie de laborator standard. — Echipamente pentru prepararea lamelor: lame de microscop clasice, lame tubulare, lamele (20 × 20 mm), pensete, spatulă fină. — Cuptor de laborator. — Centrifugă. — Filtru de hârtie: filtru din celuloză de calitate (dimensiunea porilor 4-11 μm). 2.1.3. Eșantionarea și prepararea eșantioanelor 2.1.3.1. Eșantionare Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu anexa nr. 1. 2.1.3.1.1. Uscarea eșantioanelor Eșantioanele cu un conținut de umiditate > 14 % se usucă înainte de manipulare în conformitate cu anexa nr. 3. 2.1.3.1.2. Cernerea în prealabil a eșantioanelor Pentru a colecta informații privind posibila contaminare ambientală a hranei destinate animalelor, se recomandă să se cearnă în prealabil la dimensiunea de 1 mm hrana sub formă de pelete și grăunțe și apoi să se prepare, să se analizeze și să se raporteze separat cele două fracțiuni rezultate, care trebuie să fie considerate ca eșantioane distincte. 2.1.3.2. Măsuri de precauție Pentru a se evita contaminarea încrucișată în laborator, toate echipamentele reutilizabile se curăță cu grijă înainte de utilizare. Piesele pâlniei de separare se demontează înainte de curățare. Piesele pâlniei de separare și sticlăria se prespală	

Pentru prepararea eşantioanelor constând în grăsimi se aplică următorul protocol: — Dacă grăsimea este solidă, se încălzeşte într-un cuptor până când devine lichidă. — Cu ajutorul unei pipete, 40 ml de grăsime se transferă din partea inferioară a eşantionului într-un tub de centrifugă. — Eşantionul se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 r.p.m. — Dacă grăsimea este solidă după centrifugare, se încălzeşte într-un cuptor până când devine lichidă. — Centrifugarea se repetă timp de 5 minute la 4 000 r.p.m. — Cu ajutorul unei linguriţe sau al unei spatule, jumătate din impurităţile decantate se transferă spre examinare pe lame de microscopie. Ca mediu de montare se recomandă glicerolul. — Impurităţile rămase se utilizează pentru prepararea sedimentului astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, prima liniuţă. Acelaşi protocol, cu excepţia primei şi a celei de a patra liniuţe, se aplică pentru prepararea eşantioanelor de ulei. 2.1.3.4. Prepararea altor eşantioane decât de grăsimi sau uleiuri 2.1.3.4.1. Subeşantionare şi măcinare: cel puţin 50 g din eşantion se subeşantionează pentru analizare şi ulterior se macină. 2.1.3.4.2. Prepararea materiei prime: se prepară o porţiune de cel puţin 5 g de subeşantion măcinat. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm şi se examinează cele două fracţiuni rezultate. 2.1.3.4.3. Sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea constituenţilor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre. — Extragerea şi prepararea sedimentului: O porţiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeşantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare sau în paharul de sedimentare conic şi se adaugă 50 ml de TCE. Porţiunea	manual şi apoi se spală într-o maşină de spălat. Sitele se curăţă utilizând o perie cu peri sintetici aspri. Se recomandă curăţarea finală a sitelor cu acetonă şi aer comprimat după cernerea materiilor grase, precum făina de peşte. 2.1.3.3. Prepararea eşantioanelor constând în grăsimi sau uleiuri Pentru prepararea eşantioanelor constând în grăsimi se aplică următorul protocol: — Dacă grăsimea este solidă, se încălzeşte într-un cuptor până când devine lichidă. — Cu ajutorul unei pipete, 40 ml de grăsime se transferă din partea inferioară a eşantionului într-un tub de centrifugă. — Eşantionul se centrifughează timp de 10 minute la 4 000 r.p.m. — Dacă grăsimea este solidă după centrifugare, se încălzeşte într-un cuptor până când devine lichidă. — Centrifugarea se repetă timp de 5 minute la 4 000 r.p.m. — Cu ajutorul unei linguriţe sau al unei spatule, jumătate din impurităţile decantate se transferă spre examinare pe lame de microscopie. Ca mediu de montare se recomandă glicerolul. — Impurităţile rămase se utilizează pentru prepararea sedimentului astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, prima liniuţă. Acelaşi protocol, cu excepţia primei şi a celei de a patra liniuţe, se aplică pentru prepararea eşantioanelor de ulei. 2.1.3.4. Prepararea altor eşantioane decât de grăsimi sau uleiuri 2.1.3.4.1. Subeşantionare şi măcinare: cel puţin 50 g din eşantion se subeşantionează pentru analizare şi ulterior se macină. 2.1.3.4.2. Prepararea materiei prime: se prepară o porţiune de cel puţin 5 g de subeşantion măcinat. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm şi se examinează cele două fracţiuni rezultate.	

transferată în pâlnie se limitează la 3 g în cazul făinii de pește sau al altor produse de origine pur animală, al ingredientelor minerale sau al preamestecurilor care generează sedimente în proporție de peste 10 %. Amestecul se agită energic cel puțin 30 de secunde și se mai adaugă cu atenție 50 ml de TCE în timp ce se spală suprafața interioară a pâlniei pentru a îndepărta orice urmă de particule aderente. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute înainte de a separa sedimentul prin deschiderea robinetului. Dacă se utilizează un pahar de sedimentare conic, se agită energic amestecul timp de cel puțin 15 secunde, iar particulele care aderă la pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul se lasă să stea 3 minute și apoi se agită din nou timp de 15 secunde, iar particulele care aderă pe pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute, iar apoi fracțiunea lichidă se înlătură și se elimină prin decantare atentă, având grijă să nu se piardă nimic din sediment. Sedimentul se colectează într-un filtru de hârtie plasat într-o pâlnie pentru a permite separarea restului de TCE, evitându-se în același timp depunerile de grăsime în sediment. Sedimentul se usucă. Se recomandă cântărirea ulterioară a sedimentului (cu o precizie de 0,001 g) pentru a controla etapa de sedimentare. La final, sedimentul se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară. — Extragerea și prepararea materiei flotante: După recuperarea sedimentului prin metoda descrisă mai sus, rămân două faze în pâlnia de separare: una lichidă constând în TCE și una solidă alcătuită din materie flotantă. Această fază solidă este materia flotantă și se recuperează vărsând afară toată TCE din pâlnie prin deschiderea robinetului. Prin răsturnarea pâlniei de separare, materia flotantă este transferată într-o placă	2.1.3.4.3. Sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea constituenților de origine animală, alta decât nevertebratele terestre. — Extragerea și prepararea sedimentului: O porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare sau în paharul de sedimentare conic și se adaugă 50 ml de TCE. Porțiunea transferată în pâlnie se limitează la 3 g în cazul făinii de pește sau al altor produse de origine pur animală, al ingredientelor minerale sau al preamestecurilor care generează sedimente în proporție de peste 10 %. Amestecul se agită energic cel puțin 30 de secunde și se mai adaugă cu atenție 50 ml de TCE în timp ce se spală suprafața interioară a pâlniei pentru a îndepărta orice urmă de particule aderente. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute înainte de a separa sedimentul prin deschiderea robinetului. Dacă se utilizează un pahar de sedimentare conic, se agită energic amestecul timp de cel puțin 15 secunde, iar particulele care aderă la pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul se lasă să stea 3 minute și apoi se agită din nou timp de 15 secunde, iar particulele care aderă pe pereții paharului se spală cu atenție de pe suprafața interioară cu cel puțin 10 ml de TCE curată. Amestecul rezultat se lasă să stea cel puțin 5 minute, iar apoi fracțiunea lichidă se înlătură și se elimină prin decantare atentă, având grijă să nu se piardă nimic din sediment. Sedimentul se colectează într-un filtru de hârtie plasat într-o pâlnie pentru a permite separarea restului de TCE, evitându-se în același timp depunerile de grăsime în sediment. Sedimentul se usucă. Se recomandă cântărirea ulterioară a sedimentului (cu o precizie de 0,001 g) pentru a controla etapa de sedimentare. La final, sedimentul se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două	

Petri mare și uscat cu aer într-o hotă de tiraj. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate. — Utilizarea agenților de colorare: Pentru a facilita identificarea corectă a constituenților de origine animală, operatorul poate utiliza agenți de colorare în timpul preparării eșantioanelor, în conformitate cu orientările emise de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet. În cazul în care se utilizează soluție de roșu de alizarină pentru colorarea sedimentului, se aplică următorul protocol: — Sedimentul uscat se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și 30 de secunde și se elimină prin vărsare). — Sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu. Se permite ca reacția să continue timp de 10 minute. Eprubeta se umple cu apă, sedimentul se lasă să se decanteze timp de 2-3 minute, iar apa și particulele în suspensie se elimină cu grijă prin vărsare. — Sedimentul se mai clătește de două ori cu aproximativ 10 ml de apă (se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, se lasă să se decanteze și se varsă apa de fiecare dată). — Se adaugă între 2 și 10 picături de soluție de roșu de alizarină, iar amestecul se agită. Se permite desfășurarea reacției timp de 30 de secunde, iar sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol, apoi o dată cu acetonă (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și se varsă afară). — Sedimentul colorat se usucă. 2.1.3.4.4. Sedimentarea dublă PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate.	fracțiuni rezultate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară. — Extragerea și prepararea materiei flotante: După recuperarea sedimentului prin metoda descrisă mai sus, rămân două faze în pâlnia de separare: una lichidă constând în TCE și una solidă alcătuită din materie flotantă. Această fază solidă este materia flotantă și se recuperează vărsând afară toată TCE din pâlnie prin deschiderea robinetului. Prin răsturnarea pâlniei de separare, materia flotantă este transferată într-o placă Petri mare și uscat cu aer într-o hotă de tiraj. Se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate. — Utilizarea agenților de colorare: Pentru a facilita identificarea corectă a constituenților de origine animală, operatorul poate utiliza agenți de colorare în timpul preparării eșantioanelor, în conformitate cu orientările emise de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet. În cazul în care se utilizează soluție de roșu de alizarină pentru colorarea sedimentului, se aplică următorul protocol: — Sedimentul uscat se transferă într-o eprubetă de sticlă și se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și 30 de secunde și se elimină prin vărsare). — Sedimentul se decolorează adăugându-se cel puțin 1 ml de soluție de hipoclorit de sodiu. Se permite ca reacția să continue timp de 10 minute. Eprubeta se umple cu apă, sedimentul se lasă să se decanteze timp de 2-3 minute, iar apa și particulele în suspensie se elimină cu grijă prin vărsare. — Sedimentul se mai clătește de două ori cu aproximativ 10 ml de apă (se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, se lasă să se decanteze și se varsă apa de fiecare dată). — Se adaugă între 2 și 10 picături de soluție de roșu de alizarină, iar amestecul se agită. Se permite desfășurarea	

Toate etapele se realizează într-o pâlnie de separare conică din sticlă de 250 ml, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.2, a patra liniuță. — O porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare și se supune mai întâi unei singure sedimentări cu TCE, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, inclusiv recuperării sedimentului pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Acest sediment poate fi utilizat ca cel obținut la punctul 2.1.3.4.3. — Volumul mic de TCE drenat împreună cu sedimentul se transferă într-un cilindru gradat. Prin deschiderea robinetului pâlniei de separare, cilindrul gradat trebuie umplut suplimentar până la obținerea a 30 ml de TCE. După atingerea acestui volum, robinetul se închide. — Acest volum colectat de TCE se înlocuiește prin adăugarea unui volum de 30 ml de eter de petrol cu punct de fierbere 40-60 °C în pâlnia de separare. Conținutul pâlniei de separare se amestecă minuțios pentru a obține un amestec 30 % PE/70 % TCE (cu o densitate de aproximativ 1,26 g x cm⁻³). Se lasă materialul să se decanteze timp de 10 minute. Două fracțiuni noi se vor separa: un al doilea sediment și o materie flotantă finală (< 1,26 g x cm⁻³). Al doilea sediment se recuperează într-o placă Petri (sau cu o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie) prin deschiderea robinetului până când în pâlnia de separare rămân doar puțin amestec de solvent și puțină materie flotantă finală. Lichidul rămas și materia flotantă finală se colectează separat pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Peretele pâlniei de separare se clătește cu un jet de PE pentru a colecta toate materialele din materia flotantă finală. Materia flotantă finală se lasă să se usuce. La final, materia flotantă finală se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate în vederea depistării constituenților proveniți de la animale nevertebrate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară.	reacției timp de 30 de secunde, iar sedimentul colorat se clătește de două ori cu aproximativ 5 ml de etanol, apoi o dată cu acetonă (de fiecare dată se utilizează un agitator timp de 30 de secunde, solventul se lasă să se decanteze timp de aproximativ 1 minut și se varsă afară). — Sedimentul colorat se usucă. 2.1.3.4.4. Sedimentarea dublă PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate. Toate etapele se realizează într-o pâlnie de separare conică din sticlă de 250 ml, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.2, a patra liniuță. — O porțiune de 10 g (cu o precizie de 0,01 g) din subeșantionul măcinat se transferă în pâlnia de separare și se supune mai întâi unei singure sedimentări cu TCE, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.3, inclusiv recuperării sedimentului pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Acest sediment poate fi utilizat ca cel obținut la punctul 2.1.3.4.3. — Volumul mic de TCE drenat împreună cu sedimentul se transferă într-un cilindru gradat. Prin deschiderea robinetului pâlniei de separare, cilindrul gradat trebuie umplut suplimentar până la obținerea a 30 ml de TCE. După atingerea acestui volum, robinetul se închide. — Acest volum colectat de TCE se înlocuiește prin adăugarea unui volum de 30 ml de eter de petrol cu punct de fierbere 40-60 °C în pâlnia de separare. Conținutul pâlniei de separare se amestecă minuțios pentru a obține un amestec 30 % PE/70 % TCE (cu o densitate de aproximativ 1,26 g x cm⁻³). Se lasă materialul să se decanteze timp de 10 minute. Două fracțiuni noi se vor separa: un al doilea sediment și o materie flotantă finală (< 1,26 g x cm⁻³). Al doilea sediment se recuperează într-o placă Petri (sau cu o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie) prin deschiderea robinetului până când în pâlnia de separare rămân doar puțin amestec de solvent și puțină materie flotantă finală. Lichidul rămas și materia	

2.1.4. Examinare microscopică 2.1.4.1. Prepararea lamelor Lamele de microscopie se prepară din sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie din materia flotantă, fie din materia primă. Dacă este cazul, numai pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se prepară lame și din materia flotantă finală obținută conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4. Se prepară cele două fracțiuni rezultate (cea fină și cea grosieră). Porțiunile de testat din fracțiuni întinse pe lame trebuie să fie reprezentative pentru întreaga fracțiune. Se pregătește un număr suficient de lame pentru a se asigura că se poate efectua un protocol complet de examinare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.4.2. Lamele de microscopie se montează cu mediul de montare adecvat în conformitate cu PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet. Lamele se acoperă cu lamele de acoperire. 2.1.4.2. Diagrama de observare pentru depistarea particulelor de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Lamele de microscopie preparate se observă în conformitate cu diagramele de observare stabilite în diagramele 1 și 2. Observațiile de microscopie se realizează utilizând microscopul compus pe sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie pe materia flotantă, fie pe materia primă. În plus, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se efectuează observații și asupra materiei flotante finale obținute conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4, în conformitate cu diagrama 3. Microscopul stereoscopic poate fi utilizat în plus față de microscopul compus pentru fracțiunile grosiere. Fiecare lamă se examinează în întregime la diferite amplificări. Explicații precise cu privire la modul de utilizare a	flotantă finală se colectează separat pe o hârtie de filtru plasată pe o pâlnie. Peretele pâlniei de separare se clătește cu un jet de PE pentru a colecta toate materialele din materia flotantă finală. Materia flotantă finală se lasă să se usuce. La final, materia flotantă finală se cerne la dimensiunea de 0,25 mm și se examinează cele două fracțiuni rezultate în vederea depistării constituenților proveniți de la animale nevertebrate, cu excepția cazului în care cernerea nu este considerată necesară. 2.1.4. Examinare microscopică 2.1.4.1. Prepararea lamelor Lamele de microscopie se prepară din sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie din materia flotantă, fie din materia primă. Dacă este cazul, numai pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se prepară lame și din materia flotantă finală obținută conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4. Se prepară cele două fracțiuni rezultate (cea fină și cea grosieră). Porțiunile de testat din fracțiuni întinse pe lame trebuie să fie reprezentative pentru întreaga fracțiune. Se pregătește un număr suficient de lame pentru a se asigura că se poate efectua un protocol complet de examinare, astfel cum se prevede la punctul 2.1.4.2. Lamele de microscopie se montează cu mediul de montare adecvat în conformitate cu PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet. Lamele se acoperă cu lamele de acoperire. 2.1.4.2. Diagrama de observare pentru depistarea particulelor de origine animală în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale. Lamele de microscopie preparate se observă în conformitate cu diagramele de observare stabilite în diagramele 1 și 2.	

diagramelor sunt detaliate printr-o PSO stabilită de EURL-AP și publicată pe site-ul său de internet. Numărul minim de lame care trebuie observate în fiecare etapă a diagramelor de observare trebuie să fie strict respectat, cu excepția cazului în care întregul material al fracțiunii nu permite să se ajungă la numărul prevăzut de lame, de exemplu atunci când nu se obține deloc sediment. Nu se utilizează mai mult de 6 lame pentru fiecare determinare pentru înregistrarea numărului de particule. În cazul în care se prepară lame suplimentare cu ajutorul unui mediu de montare mai specific, cu proprietăți de colorare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.4, pe materia flotantă sau pe materia primă pentru a caracteriza suplimentar structurile (de exemplu, pene, păr, mușchi sau particule de sânge), care au fost depistate pe lamele preparate cu alte medii de montare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.3, numărul de particule se numără pe baza unui număr de lame per determinare care nu depășește 6, inclusiv lamele suplimentare cu un mediu de montare mai specific. Lamele suplimentare preparate din materia flotantă finală obținută, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.4, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre nu se iau în considerare pentru identificarea altor naturi (vertebrate terestre și pești). Pentru a facilita identificarea naturii și originii particulelor, operatorul poate utiliza instrumente de sprijin cum ar fi sisteme de asistare în luarea deciziilor, biblioteci de imagini și eșantioane de referință. <i>Diagrama 1</i> Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru prima determinare	Observațiile de microscopie se realizează utilizând microscopul compus pe sediment și, în funcție de alegerea operatorului, fie pe materia flotantă, fie pe materia primă. În plus, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, se efectuează observații și asupra materiei flotante finale obținute conform descrierii de la punctul 2.1.3.4.4, în conformitate cu diagrama 3. Microscopul stereoscopic poate fi utilizat în plus față de microscopul compus pentru fracțiunile grosiere. Fiecare lamă se examinează în întregime la diferite amplificări. Explicații precise cu privire la modul de utilizare a diagramelor sunt detaliate printr-o PSO stabilită de EURL-AP și publicată pe site-ul său de internet. Numărul minim de lame care trebuie observate în fiecare etapă a diagramelor de observare trebuie să fie strict respectat, cu excepția cazului în care întregul material al fracțiunii nu permite să se ajungă la numărul prevăzut de lame, de exemplu atunci când nu se obține deloc sediment. Nu se utilizează mai mult de 6 lame pentru fiecare determinare pentru înregistrarea numărului de particule. În cazul în care se prepară lame suplimentare cu ajutorul unui mediu de montare mai specific, cu proprietăți de colorare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.4, pe materia flotantă sau pe materia primă pentru a caracteriza suplimentar structurile (de exemplu, pene, păr, mușchi sau particule de sânge), care au fost depistate pe lamele preparate cu alte medii de montare, astfel cum se descrie la punctul 2.1.2.1.3, numărul de particule se numără pe baza unui număr de lame per determinare care nu depășește 6, inclusiv lamele suplimentare cu un mediu de montare mai specific. Lamele suplimentare preparate din materia flotantă finală obținută, astfel cum se descrie la punctul 2.1.3.4.4, pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre nu se iau		

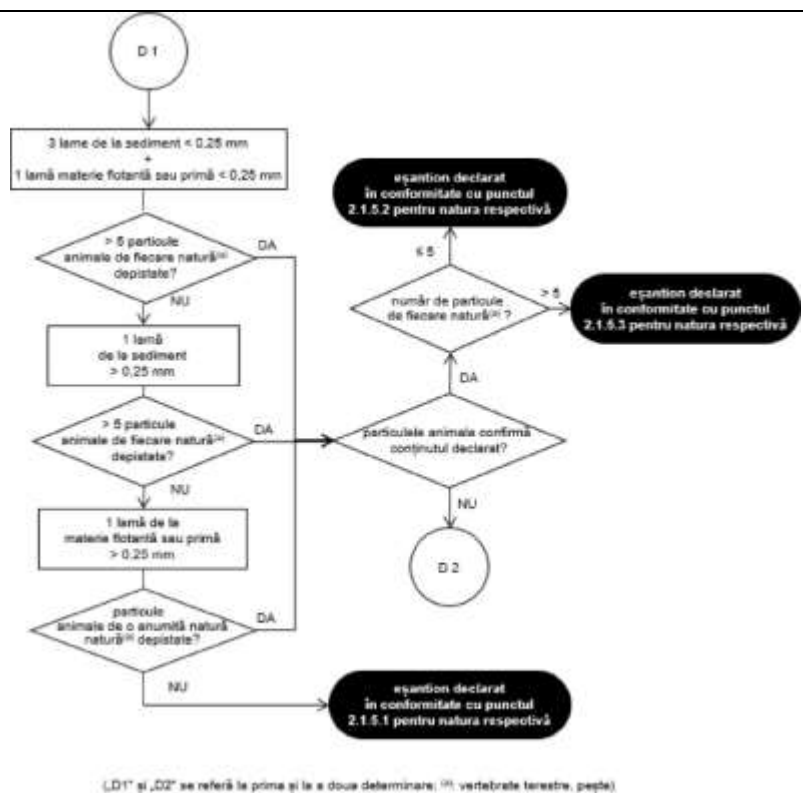


Diagrama 2
Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru a doua determinare

în considerare pentru identificarea altor naturi (vertebrate terestre și pești).

Pentru a facilita identificarea naturii și originii particulelor, operatorul poate utiliza instrumente de sprijin cum ar fi sisteme de asistare în luarea deciziilor, biblioteci de imagini și eșantioane de referință.

Diagrama 1

Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru prima determinare

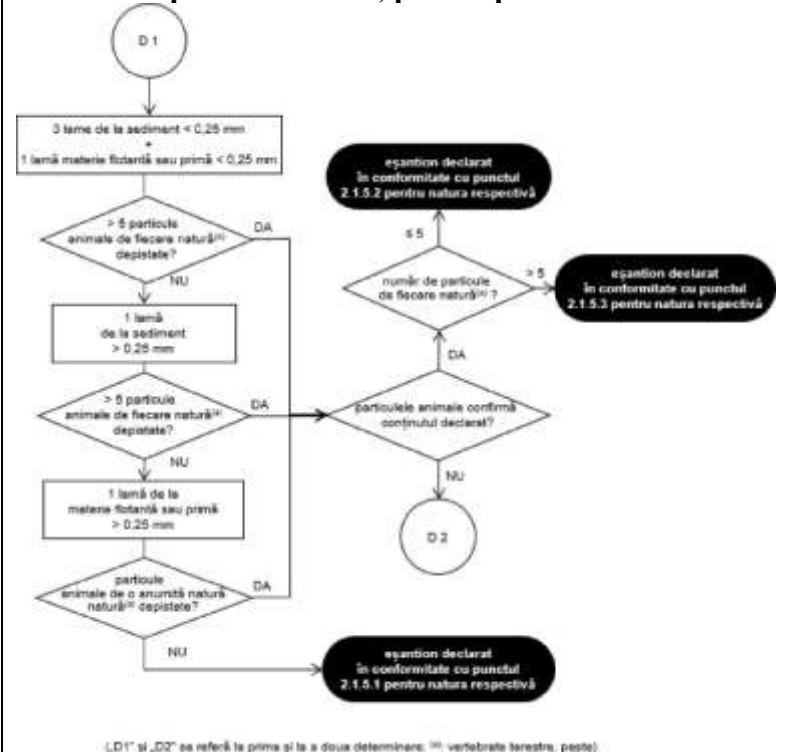


Diagrama 2

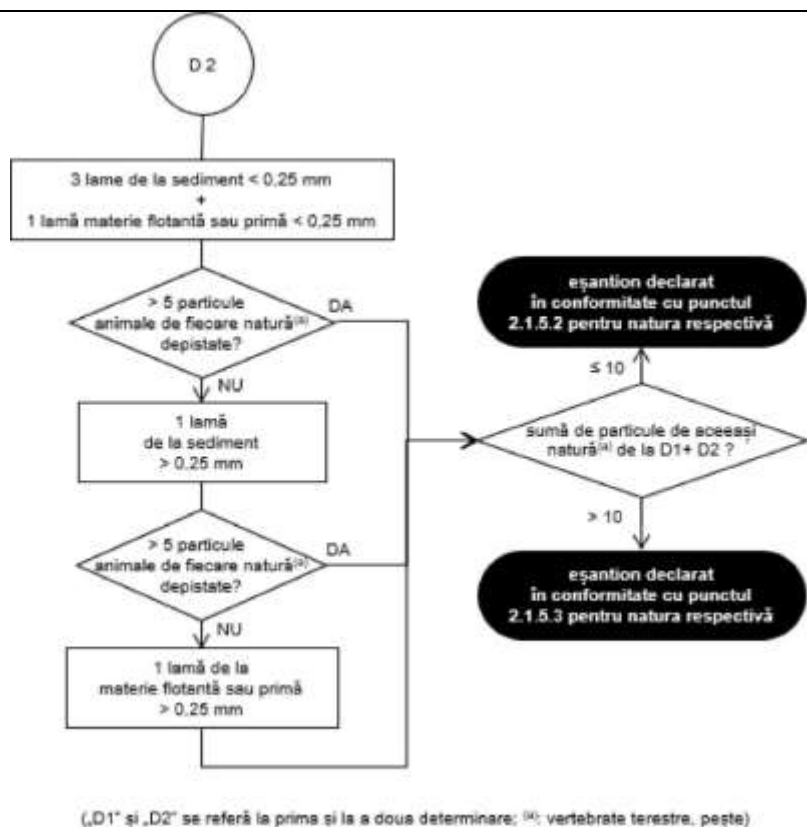


Diagrama 3
Diagramă de observare după sedimentarea dublă cu PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale

Diagramă de observare după sedimentarea doar cu TCE pentru depistarea particulelor de origine animală, alta decât nevertebratele terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale, pentru a doua determinare

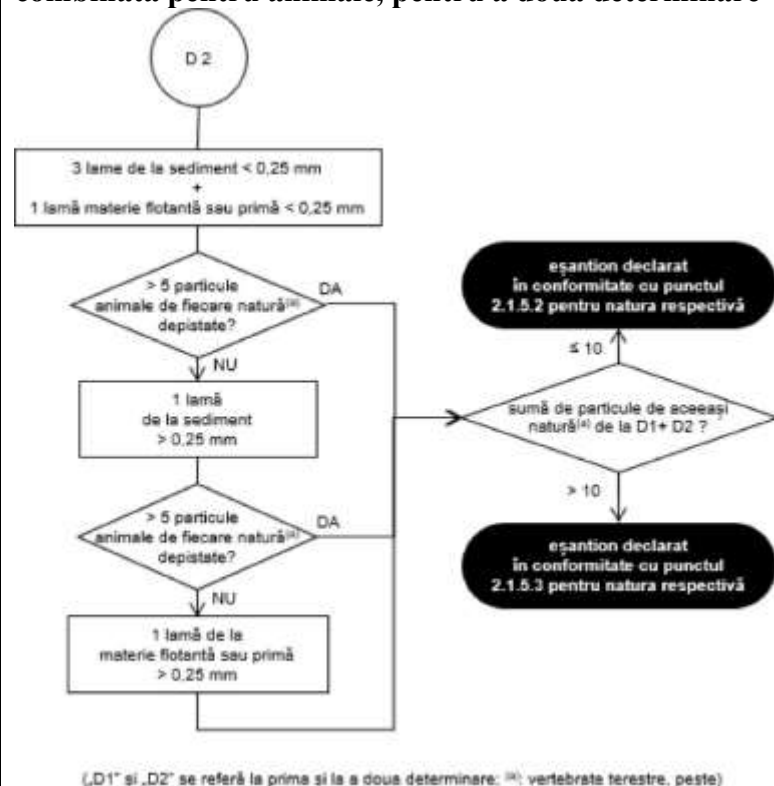
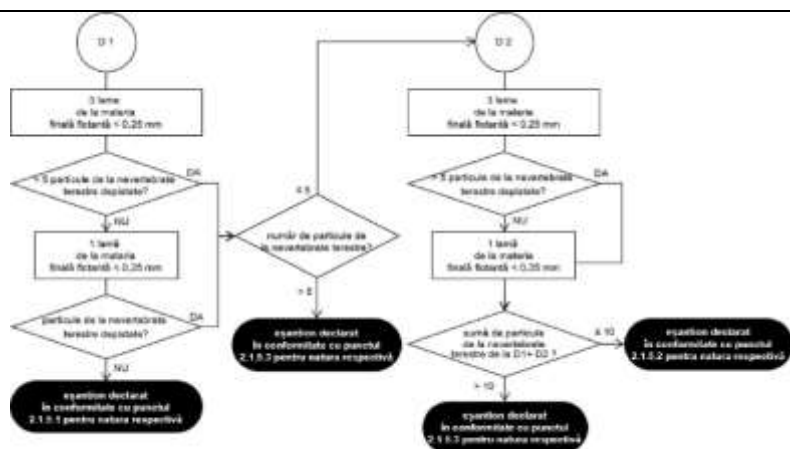


Diagrama 3
Diagramă de observare după sedimentarea dublă cu PE/TCE pentru depistarea constituenților proveniți de la nevertebrate terestre, în preamestecuri, în materiile prime pentru hrana animalelor și în hrana combinată pentru animale



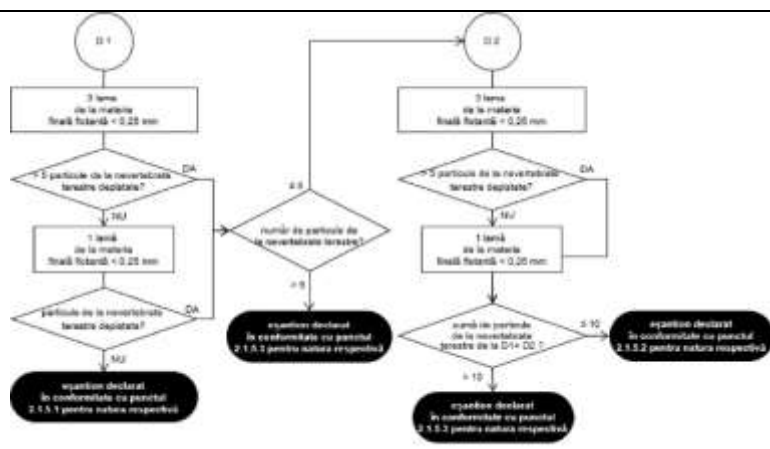
(D1 și D2 se referă la prima și la a doua determinare; DA = vertebrate terestre, pești)

2.1.4.3. Numărul de determinări

Determinările se efectuează pe subeșantioane diferite de 50 g fiecare.

Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1 sau, după caz, din diagrama 3, nu se depistează deloc particule de origine animală, nu este necesară o determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.1.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1, se depistează una sau mai multe particule de origine animală de o anumită natură (și anume, vertebrate terestre sau pești), iar natura particulelor găsite confirmă conținutul declarat al eșantionului, nu este necesară o a doua determinare. Dacă numărul particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul acestei prime determinări este mai mare de 5, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3. Altminteri, rezultatul analizei se



(D1 și D2 se referă la prima și la a doua determinare; DA = vertebrate terestre, pești)

2.1.4.3. Numărul de determinări

Determinările se efectuează pe subeșantioane diferite de 50 g fiecare.

Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1 sau, după caz, din diagrama 3, nu se depistează deloc particule de origine animală, nu este necesară o determinare suplimentară, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.1.

Dacă, în urma unei prime determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 1, se depistează una sau mai multe particule de origine animală de o anumită natură (și anume, vertebrate terestre sau pești), iar natura particulelor găsite confirmă conținutul declarat al eșantionului, nu este necesară o a doua determinare. Dacă numărul particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul acestei prime determinări este mai mare de 5, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3.

raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2. Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 3 se depistează mai mult de 5 particule provenite de la nevertebrate terestre, nu este necesară o a doua determinare, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3 pentru această natură. În toate celelalte cazuri, inclusiv atunci când nu a fost furnizată laboratorului nicio declarație cu privire la conținut, se efectuează o a doua determinare pornind de la un nou subeșantion. Dacă, în urma celei de-a doua determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 2 sau, după caz, din diagrama 3, suma particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul celor două determinări este mai mare de 10, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3. Altminteri, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2. 2.1.5. Exprimarea rezultatelor Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică tipul de material care a fost analizat (sediment, materie flotantă, materie flotantă finală sau materie primă). Raportarea indică în mod clar numărul de determinări care au fost efectuate și dacă cernerea fracțiunilor înainte de prepararea lamelor, în conformitate cu punctul 2.1.3.4.3, prima liniuță, al treilea paragraf sau cu punctul 2.1.3.4.4, a treia liniuță, nu a fost efectuată. Raportul laboratorului conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din vertebrate terestre și din pești. Diferitele situații se raportează în modul următor:	Altminteri, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2. Dacă, în urma primei determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 3 se depistează mai mult de 5 particule provenite de la nevertebrate terestre, nu este necesară o a doua determinare, iar rezultatul analizei se raportează utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3 pentru această natură. În toate celelalte cazuri, inclusiv atunci când nu a fost furnizată laboratorului nicio declarație cu privire la conținut, se efectuează o a doua determinare pornind de la un nou subeșantion. Dacă, în urma celei de-a doua determinări efectuate în conformitate cu diagrama de observare din diagrama 2 sau, după caz, din diagrama 3, suma particulelor de origine animală de o anumită natură depistate pe parcursul celor două determinări este mai mare de 10, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.3. Altminteri, rezultatul analizei se raportează în funcție de natura animală utilizând formularea de la punctul 2.1.5.2. 2.1.5. Exprimarea rezultatelor Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică tipul de material care a fost analizat (sediment, materie flotantă, materie flotantă finală sau materie primă). Raportarea indică în mod clar numărul de determinări care au fost efectuate și dacă cernerea fracțiunilor înainte de prepararea lamelor, în conformitate cu punctul 2.1.3.4.3, prima liniuță, al treilea paragraf sau cu punctul 2.1.3.4.4, a treia liniuță, nu a fost efectuată. Raportul laboratorului conține cel puțin informații privind prezența constituenților derivați din vertebrate terestre și din pești. Diferitele situații se raportează în modul următor:		

2.1.5.1. Nu este depistată nicio particulă de origine animală de o anumită natură: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la vertebrate terestre.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la pești.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la nevertebrate terestre.” 2.1.5.2. Între 1 și 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate în cazul în care a fost efectuată o singură determinare, sau între 1 și 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul efectuării a două determinări (numărul de particule depistate este sub limita de decizie stabilită în PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet): În cazul în care s-a efectuat o singură determinare: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.” Atunci când au fost efectuate două determinări:	2.1.5.1. Nu este depistată nicio particulă de origine animală de o anumită natură: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la vertebrate terestre.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la pești.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu a fost depistată nicio particulă derivată de la nevertebrate terestre.” 2.1.5.2. Între 1 și 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate în cazul în care a fost efectuată o singură determinare, sau între 1 și 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul efectuării a două determinări (numărul de particule depistate este sub limita de decizie stabilită în PSO stabilite de EURL-AP și publicate pe site-ul său de internet): În cazul în care s-a efectuat o singură determinare: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.” Atunci când au fost efectuate două determinări:		

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la pești pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

În plus:

— În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

— Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule de origine animală au

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la pești pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis nu au fost depistate mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre pe parcursul celor două determinări. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)]. Această prezență de nivel mic se situează sub limita de decizie stabilită pentru această metodă de microscopie.”

În plus:

— În cazul cernerii în prealabil a eșantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului.

— Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule

fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre. 2.1.5.3. Mai mult de 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate atunci când s-a efectuat o singură determinare sau mai mult de 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul a două determinări: În cazul în care s-a efectuat o singură determinare: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” Atunci când au fost efectuate două determinări: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].”	de origine animală au fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre. 2.1.5.3. Mai mult de 5 particule de origine animală de o anumită natură sunt depistate atunci când s-a efectuat o singură determinare sau mai mult de 10 particule de o anumită natură sunt depistate în cazul a două determinări: În cazul în care s-a efectuat o singură determinare: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate mai mult de 5 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” Atunci când au fost efectuate două determinări: — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la vertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [os, cartilaj, mușchi, păr, coarne, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eșantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la pești. Particulele au fost identificate ca ... [oase de pește, solzi de		

— „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eşantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” În plus: — În cazul cernerii în prealabil a eşantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului. — Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule de origine animală au fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre. <u>▼M2</u> 2.2. PCR 2.2.1. Principiu Fragmentele de acid dezoxiribonucleic (ADN) de origine animală care pot fi prezente în materiile prime furajere și furajele combinate sunt detectate printr-o tehnică de amplificare genetică prin PCR, care vizează secvențe de ADN specifice speciei. Metoda PCR necesită, în primul rând, o etapă de extragere a ADN-ului. Etapa de amplificare se aplică ulterior extractului de ADN astfel obținut, în vederea detectării speciilor de animale vizate de test. 2.2.2. Reactivi și echipamente 2.2.2.1. Reactivi 2.2.2.1.1. Reactivi pentru etapa de extragere a ADN-ului	pește, cartilaj, mușchi, otolit, branhii, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” — „În măsura în care a fost posibil cu un microscop optic, în eşantionul transmis au fost depistate pe parcursul celor două determinări mai mult de 10 particule derivate de la nevertebrate terestre. Particulele au fost identificate ca ... [fragmente de cuticulă, părți de gură, mușchi, structuri traheale, altele (vă rugăm precizați, după caz)].” În plus: — În cazul cernerii în prealabil a eşantioanelor, raportul laboratorului menționează fracțiunea în care (fracțiune cernută, fracțiune sub formă de pelete sau grăunțe) au fost depistate particulele de origine animală, întrucât depistarea particulelor de origine animală numai în fracțiunea cernută poate fi semnul unei contaminări a mediului. — Atunci când se depistează doar particule de origine animală care nu pot fi clasificate ca provenind de la vertebrate terestre sau de la pești (de exemplu, fibre musculare), raportul menționează că doar astfel de particule de origine animală au fost depistate și că nu se poate exclude faptul că provin de la vertebrate terestre. 2.2. PCR 2.2.1. Principiu Fragmentele de acid dezoxiribonucleic (ADN) de origine animală care pot fi prezente în materiile prime furajere și furajele combinate sunt detectate printr-o tehnică de amplificare genetică prin PCR, care vizează secvențe de ADN specifice speciei. Metoda PCR necesită, în primul rând, o etapă de extragere a ADN-ului. Etapa de amplificare se aplică ulterior extractului de ADN astfel obținut, în vederea detectării speciilor de animale vizate de test. 2.2.2. Reactivi și echipamente 2.2.2.1. Reactivi	

Se utilizează numai reactivii aprobați de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicați pe site-ul internet al acestuia. 2.2.2.1.2. Reactivi pentru etapa de amplificare genetică 2.2.2.1.2.1. Primeri și sonde Se utilizează numai primerii și sondele cu secvențe de oligonucleotide validate de către laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale (48). 2.2.2.1.2.2. Amestecul principal Se utilizează doar soluțiile de amestec principal care nu conțin reactivi susceptibili să conducă la rezultate false datorită prezenței de ADN animal (49). 2.2.2.1.2.3. Reactivi de decontaminare 2.2.2.1.2.3.1. Soluție de acid clorhidric (0,1N) 2.2.2.1.2.3.2. Înălbitor (soluție de hipoclorit de sodiu la 0,15 % din clor activ) 2.2.2.1.2.3.3. Reactivi necorozivi pentru decontaminarea dispozitivelor costisitoare, precum balanțele analitice (de exemplu, DNA Erase™ al MP Biomedicals) 2.2.2.2. Echipamente 2.2.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g 2.2.2.2.2. Echipament de măcinare 2.2.2.2.3. Thermocycler care permite PCR în timp real 2.2.2.2.4. Microcentrifugă pentru tuburi de microcentrifugare 2.2.2.2.5. Set de micropipete care permit introducerea cu pipeta de la 1 µl până la 1 000 µl 2.2.2. Material de plastic standard de biologie moleculară: 2.6. tuburi de microcentrifugare, vârfuri de plastic filtrate pentru micropipete, plăci adecvate pentru thermocycler. 2.2.2.2. Congelatoare pentru depozitarea eşantioanelor și 7. reactivilor 2.2.3. Eşantionarea și pregătirea eşantioanelor	2.2.2.1.1. Reactivi pentru etapa de extragere a ADN-ului Se utilizează numai reactivii aprobați de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicați pe site-ul internet al acestuia. 2.2.2.1.2. Reactivi pentru etapa de amplificare genetică 2.2.2.1.2.1. Primeri și sonde Se utilizează numai primerii și sondele cu secvențe de oligonucleotide validate de către laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale (48). 2.2.2.1.2.2. Amestecul principal Se utilizează doar soluțiile de amestec principal care nu conțin reactivi susceptibili să conducă la rezultate false datorită prezenței de ADN animal (49). 2.2.2.1.2.3. Reactivi de decontaminare 2.2.2.1.2.3.1. Soluție de acid clorhidric (0,1N) 2.2.2.1.2.3.2. Înălbitor (soluție de hipoclorit de sodiu la 0,15 % din clor activ) 2.2.2.1.2.3.3. Reactivi necorozivi pentru decontaminarea dispozitivelor costisitoare, precum balanțele analitice (de exemplu, DNA Erase™ al MP Biomedicals) 2.2.2.2. Echipamente 2.2.2.2.1. Balanță analitică cu o precizie de 0,001 g 2.2.2.2.2. Echipament de măcinare 2.2.2.2.3. Thermocycler care permite PCR în timp real 2.2.2.2.4. Microcentrifugă pentru tuburi de microcentrifugare 2.2.2.2.5. Set de micropipete care permit introducerea cu pipeta de la 1 µl până la 1 000 µl 2.2.2. Material de plastic standard de biologie moleculară: 2.6. tuburi de microcentrifugare, vârfuri de plastic filtrate	

2.2.3.1. Eșantionare Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa I. 2.2.3.2. Pregătirea eșantioanelor Pregătirea eșantioanelor de laborator înainte de extragerea ADN-ului respectă cerințele prevăzute în anexa II. Cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate. Pregătirea eșantioanelor se efectuează într-o încăpere diferită de cele dedicate extragerii ADN-ului și reacțiilor de amplificare genetică descrise în ISO 24276. Se pregătesc două porțiuni de testat de cel puțin 100 mg fiecare. 2.2.4. Extragerea ADN-ului Extragerea ADN-ului se efectuează pe fiecare porțiune de testat pregătită utilizând PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Se pregătesc două controale de extragere pentru fiecare serie de extrageri descrise în ISO 24276: — un control martor de extragere; — un control de extragere al ADN-ului pozitiv. 2.2.5. Amplificarea genetică Amplificarea genetică se efectuează utilizând metodele validate pentru fiecare specie care necesită identificare. Aceste metode sunt prevăzute în PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Fiecare extract de ADN se analizează în cel puțin două diluții diferite în scopul de a evalua inhibarea. Se pregătesc două controale de amplificare pentru fiecare specie țintă, astfel cum se descrie în ISO 24276. — se utilizează un control țintă al ADN-ului pozitiv pentru fiecare placă sau serie de teste PCR;	pentru micropipete, plăci adecvate pentru thermocycler. 2.2.2.2. Congelatoare pentru depozitarea eșantioanelor și reactivilor 2.2.3. Eșantionarea și pregătirea eșantioanelor 2.2.3.1. Eșantionare Se utilizează un eșantion reprezentativ, prelevat în conformitate cu dispozițiile prevăzute în anexa nr. 1. 2.2.3.2. Pregătirea eșantioanelor Pregătirea eșantioanelor de laborator înainte de extragerea ADN-ului respectă cerințele prevăzute în anexa nr. 2. Cel puțin 50 g din eșantion constituie subeșantioane pentru a fi analizate și ulterior măcinate. Pregătirea eșantioanelor se efectuează într-o încăpere diferită de cele dedicate extragerii ADN-ului și reacțiilor de amplificare genetică descrise în SM EN ISO 24276:2014. Se pregătesc două porțiuni de testat de cel puțin 100 mg fiecare. 2.2.4. Extragerea ADN-ului Extragerea ADN-ului se efectuează pe fiecare porțiune de testat pregătită utilizând PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Se pregătesc două controale de extragere pentru fiecare serie de extrageri descrise în SM EN ISO 24276:2014: — un control martor de extragere; — un control de extragere al ADN-ului pozitiv. 2.2.5. Amplificarea genetică Amplificarea genetică se efectuează utilizând metodele validate pentru fiecare specie care necesită identificare. Aceste metode sunt prevăzute în PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în	

— se utilizează un control al reactivului de amplificare (denumit, de asemenea, control fără etalon) pentru fiecare placă sau serie de teste PCR. 2.2.6. Interpretarea și exprimarea rezultatelor Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică cel puțin greutatea porțiunilor de testat utilizate, tehnica de extragere utilizată, numărul de determinări efectuate și limita de detecție a metodei. Rezultatele nu sunt interpretate și raportate în cazul în care controlul de extragere al ADN-ului pozitiv și controalele țintă ale ADN-ului pozitiv nu oferă rezultate pozitive pentru obiectivul care face obiectul testului, în timp ce controlul reactivului de amplificare este negativ. În cazul în care rezultatele celor două porțiuni de testat nu sunt consecvente, se repetă cel puțin etapa de amplificare genetică. În cazul în care laboratorul suspectează că extractele de ADN pot fi cauza inconsecvenței, se efectuează o nouă extracție de ADN și o altă amplificare genetică înainte de interpretarea rezultatelor. Exprimarea finală a rezultatelor se bazează pe integrarea și interpretarea rezultatelor celor două porțiuni de testat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. 2.2.6.1. Rezultat negativ Un rezultat negativ este raportat după cum urmează: Niciun ADN de la X nu a fost detectat în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test). 2.2.6.2. Rezultat pozitiv Un rezultat pozitiv este raportat după cum urmează: A fost detectat ADN de la X în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).	hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. Fiecare extract de ADN se analizează în cel puțin două diluții diferite în scopul de a evalua inhibarea. Se pregătesc două controale de amplificare pentru fiecare specie țintă, astfel cum se descrie în SM EN ISO 24276:2014. — se utilizează un control țintă al ADN-ului pozitiv pentru fiecare placă sau serie de teste PCR; — se utilizează un control al reactivului de amplificare (denumit, de asemenea, control fără etalon) pentru fiecare placă sau serie de teste PCR. 2.2.6. Interpretarea și exprimarea rezultatelor Atunci când raportează rezultatele, laboratorul indică cel puțin greutatea porțiunilor de testat utilizate, tehnica de extragere utilizată, numărul de determinări efectuate și limita de detecție a metodei. Rezultatele nu sunt interpretate și raportate în cazul în care controlul de extragere al ADN-ului pozitiv și controalele țintă ale ADN-ului pozitiv nu oferă rezultate pozitive pentru obiectivul care face obiectul testului, în timp ce controlul reactivului de amplificare este negativ. În cazul în care rezultatele celor două porțiuni de testat nu sunt consecvente, se repetă cel puțin etapa de amplificare genetică. În cazul în care laboratorul suspectează că extractele de ADN pot fi cauza inconsecvenței, se efectuează o nouă extracție de ADN și o altă amplificare genetică înainte de interpretarea rezultatelor. Exprimarea finală a rezultatelor se bazează pe integrarea și interpretarea rezultatelor celor două porțiuni de testat în conformitate cu PSO stabilite de laboratorul de referință al UE pentru detectarea proteinelor animale în hrana pentru animale și publicate pe site-ul internet al acestuia. 2.2.6.1. Rezultat negativ Un rezultat negativ este raportat după cum urmează:	

Niciun ADN de la X nu a fost detectat în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).

2.2.6.2. **Rezultat pozitiv**

Un rezultat pozitiv este raportat după cum urmează:

A fost detectat ADN de la X în eșantionul prezentat (X fiind specia de animale sau grupul de specii de animale care sunt vizate de test).

ANEXA VII

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A FURAJELOR PENTRU PĂSĂRI DE CURTE

1. METODA DE CALCUL ȘI EXPRIMAREA VALORII ENERGETICE

Valoarea energetică a hranei combinate pentru păsările de curte se calculează aplicându-se formula de mai jos, pe baza procentajului anumitor compuși analitici ai furajelor pentru păsări de curte. Această valoare se exprimă în megajouli (MJ) de energie metabolizabilă (EM), corectată pentru azot, per kilogram de furaje combinate:

MJ/kg de EM = $0,1551 \times \% \text{ proteină brută} + 0,3431 \times \% \text{ grăsime brută} + 0,1669 \times \% \text{ amidon} + 0,1301 \times \% \text{ zaharuri totale}$ (exprimate în zaharoză).

2. TOLERANȚE APLICABILE VALORILOR DECLARATE

În cazul în care la inspecția oficială se constată o diferență (valoare energetică mai mare sau mai mică a furajului) între rezultatul inspecției și valoarea energetică menționată, se admite o toleranță de 0,4 MJ/kg EM.

3. EXPRIMAREA REZULTATULUI

Rezultatul obținut prin aplicarea formulei menționate se exprimă cu o zecimală.

Anexă nr.7
cu privire la aprobarea
metodelor de analiză pentru
controlul oficial al furajelor

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A FURAJELOR PENTRU PĂSĂRI DE CURTE

1. METODA DE CALCUL ȘI EXPRIMAREA VALORII ENERGETICE

Valoarea energetică a hranei combinate pentru păsările de curte se calculează aplicându-se formula de mai jos, pe baza procentajului anumitor compuși analitici ai furajelor pentru păsări de curte. Această valoare se exprimă în megajouli (MJ) de energie metabolizabilă (EM), corectată pentru azot, per kilogram de furaje combinate:

MJ/kg de EM = $0,1551 \times \% \text{ proteină brută} + 0,3431 \times \% \text{ grăsime brută} + 0,1669 \times \% \text{ amidon} + 0,1301 \times \% \text{ zaharuri totale}$ (exprimate în zaharoză).

2. TOLERANȚE APLICABILE VALORILOR DECLARATE

În cazul în care la inspecția oficială se constată o diferență (valoare energetică mai mare sau mai mică a furajului) între rezultatul inspecției și valoarea energetică menționată, se admite o toleranță de 0,4 MJ/kg EM.

Compatibil

4. METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE ANALIZĂ

Prelevarea eșantionului din furajele combinate și determinarea conținutului de compuși analitici indicați în metoda de calcul trebuie să se efectueze în conformitate cu metodele Uniunii de eșantionare și de analiză pentru controlul oficial al hranei pentru animale.

Se aplică următoarele metode:

— pentru determinarea conținutului de grăsime brută: procedura B a metodei de determinare a uleiurilor și a grăsimilor brute, din anexa III partea G;

— pentru determinarea conținutului de amidon: metoda polarimetrică, din anexa III partea K.

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A MATERIILOR PRIME DESTINATE HRANEI ANIMALELOR ȘI A HRANEI COMBinate PENTRU PISICI ȘI CÂINI

Valoarea energetică a materiilor prime destinate hranei animalelor și a hranei combinate pentru pisici și câini se calculează în conformitate cu EN 16967 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – ecuații predictive pentru energia metabolizabilă în materiile prime destinate hranei animalelor și în hrana combinată pentru animale (hrană pentru animale de companie) pentru pisici și câini, inclusiv în alimentele dietetice.

[**▼M9**](#) _____

[**▼B**](#)

3. EXPRIMAREA REZULTATULUI

Rezultatul obținut prin aplicarea formulei menționate se exprimă cu o zecimală.

4. METODE DE EȘANTIONARE ȘI DE ANALIZĂ

Prelevarea eșantionului din furajele combinate și determinarea conținutului de compuși analitici indicați în metoda de calcul trebuie să se efectueze în conformitate cu metodele Uniunii de eșantionare și de analiză pentru controlul oficial al hranei pentru animale.

Se aplică următoarele metode:

— pentru determinarea conținutului de grăsime brută: procedura B a metodei de determinare a uleiurilor și a grăsimilor brute, din anexa nr. 3 partea G;

— pentru determinarea conținutului de amidon: metoda polarimetrică, din anexa nr. 3 partea K.

METODA DE CALCUL A VALORII ENERGETICE A MATERIILOR PRIME DESTINATE HRANEI ANIMALELOR ȘI A HRANEI COMBinate PENTRU PISICI ȘI CÂINI

Valoarea energetică a materiilor prime destinate hranei animalelor și a hranei combinate pentru pisici și câini se calculează în conformitate cu SM EN 16967:2018 Hrană pentru animale: Metode de eșantionare și de analiză – ecuații predictive pentru energia metabolizabilă în materiile prime destinate hranei animalelor și în hrana combinată pentru animale (hrană pentru animale de companie) pentru pisici și câini, inclusiv în alimentele dietetice.

3. Prezenta hotărâre intră în vigoare la expirarea termenului de o lună de la data publicării în Monitorul Oficial al Republicii Moldova.



MD-2004, Chisinau, 162 Stefan cel Mare si Sfânt Blvd
Tel. 204512; e-mail: cancelaria@maia.gov.md

CERERE
privind înregistrarea de către Cancelaria de Stat
a proiectelor de acte ale Guvernului

Nr. crt.	Criterii de înregistrare	Nota autorului
1.	Categoria și denumirea proiectului	Proiectul de hotărâre de modificare a Hotărârii Guvernului nr. 686/2012 cu privire la aprobarea metodelor de analiză pentru controlul oficial al furajelor.
2.	Autoritatea care a elaborat proiectul	Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare
3.	Justificarea depunerii cererii	Proiectul de hotărâre a fost elaborat la inițiativa Ministerului în vederea actualizării conținutului tehnic al anexelor Hotărârii Guvernului nr. 686/2012, ca urmare a modificărilor și completărilor ulterioare operate asupra Regulamentului (UE) nr. 152/2009 al Comisiei.
4.	Referința la documentul de planificare care prevede elaborarea proiectului (<i>PNA, PND, PNR, alte documente de planificare sectoriale</i>)	Proiectul Hotărârii Guvernului vine întru executarea acțiunii 91 Capitolul 12 din Cluster 5 anexa A a Programului național de aderare a Republicii Moldova la Uniunea Europeană pentru anii 2025-2029, aprobat prin Hotărârea de Guvern nr.306/2025.

5.	Lista autorităților și instituțiilor a căror avizare este necesară	Ministerul Dezvoltării Economice și Digitalizării Ministerul Afacerilor Externe Ministerul Sănătății Ministerul Finanțelor Agenția Națională pentru Siguranța Alimentelor Ministerul Mediului Centrul de Armonizare a Legislației
6.	Termenul-limită pentru depunerea avizelor/expertizelor	10 zile lucrătoare
7.	Persoana responsabilă de promovarea proiectului	Executor: Rodica Fotescu, Consultantă principală al Direcției sănătate și bunăstarea animalelor; Tel.: 022 204 531; <i>email:</i> rodica.fotescu@maia.gov.md
8.	Anexe	1. Nota de fundamentare; 2. Proiectul de hotărâre a Guvernului; 3. Tabelele de concordanță.
9.	Data și ora depunerii cererii	28.01.2026
10.	Semnătura	Rodica Fotescu

Secretar de Stat

Iurie SCRIPNIC