

Αριθμός 118

Οι περί Μεθόδων Δειγματοληψίας και Ανάλυσης ή Εξέτασης των Εσπεριδοειδών για Υπολείμματα Συντηρητικών Κανονισμοί του 2002, οι οποίοι εκδόθηκαν από το Υπουργικό Συμβούλιο δυνάμει των διατάξεων του άρθρου 29 της περί Τροφίμων (Έλεγχος και Πώληση) νομοθεσίας, αφού κατατέθηκαν στη Βουλή των Αντιπροσώπων και εγκρίθηκαν από αυτή, δημοσιεύονται στην Επίσημη Εφημερίδα της Δημοκρατίας σύμφωνα με το εδάφιο (3) του άρθρου 3 του περί Καταθέσεως στη Βουλή των Αντιπροσώπων των Κανονισμών που Εκδίδονται με Εξουσιοδότηση Νόμου, Νόμου (Ν. 99 του 1989 όπως τροποποιήθηκε από το Ν. 227 του 1990).

ΟΙ ΠΕΡΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΩΛΗΣΗ) ΝΟΜΟΙ
ΤΟΥ 1996 ΕΩΣ (Αρ. 3) του 2001

Κανονισμοί δυνάμει του άρθρου 29

Με σκοπό την εναρμόνιση με την πράξη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας με τίτλο "Οδηγία του Συμβουλίου της 27ης Ιουνίου 1967 περί της χρήσεως ορισμένων συντηρητικών για την επεξεργασία της επιφάνειας των εσπεριδοειδών καθώς και περί των μέτρων ελέγχου για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των συντηρητικών μέσα και πάνω στα εσπεριδοειδή (67/427/ΕΟΚ)" (ΕΕ L 148 της 11.7.1967, σ. 1),

Το Υπουργικό Συμβούλιο, ασκώντας τις εξουσίες που χορηγούνται σ' αυτό από το άρθρο 29 των περί Τροφίμων (Έλεγχος και Πώληση) Νόμων, εκδίδει τους ακόλουθους Κανονισμούς.

54 (I) του 1996
4(I) του 2000
122(I) του 2000
40(I) του 2001
151(I) του 2001
159(I) του 2001.

1. Οι παρόντες Κανονισμοί θα αναφέρονται ως οι περί Μεθόδων Δειγματοληψίας, και Ανάλυσης ή Εξέτασης των Εσπεριδοειδών για Υπολείμματα Συντηρητικών Κανονισμοί του 2002.

Συνοπτικός
τίτλος.

2.—(1) Στους παρόντες Κανονισμούς—

Ερμηνεία.

"Νόμος" σημαίνει τους περί Τροφίμων (Έλεγχος και Πώληση) Νόμους και οποιουδήποτε άλλους νόμους τους τροποποιούν ή τους αντικαθιστούν.

54 (I) του 1996
4(I) του 2000
122(I) του 2000
40(I) του 2001
151(I) του 2001
159(I) του 2001.

(2) Οποιοδήποτε άλλοι όροι, που περιέχονται στους παρόντες Κανονισμούς και δεν ερμηνεύονται διαφορετικά, έχουν την έννοια που τους αποδίδει ο Νόμος.

3. Ανεξάρτητα από το άρθρο 16 του Νόμου, σε περίπτωση που εξουσιοδοτημένος λειτουργός παίρνει, δυνάμει του άρθρου 14 του Νόμου, δείγμα εσπεριδοειδών, διενεργεί τη δειγματοληψία και υποβάλλει το δείγμα ή μέρος αυτού σε Κυβερνητικό Χημικό, σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στο Πρώτο Παράρτημα, κάθε δε πρόσωπο, στο οποίο το Πρώτο Παράρτημα χορηγεί δικαιώματα, έχει τα εν λόγω δικαιώματα.

Δειγματοληψία
από εξουσιοδοτημένο
λειτουργό.
Πρώτο
Παράρτημα.

4.—(1) Σε περίπτωση που εξουσιοδοτημένος λειτουργός υποβάλει δείγμα εσπεριδοειδών σε Κυβερνητικό Χημικό για ανάλυση ή εξέταση, ο εν λόγω Κυβερνητικός Χημικός ή πρόσωπο υπό τις οδηγίες και την άμεση επίβλεψη του, το συντομότερο δυνατό αναλύει, ή ανάλογα με την περίπτωση, εξετάζει το υποβαλλόμενο δείγμα—

Ανάλυση ή
εξέταση
δείγματος ή
μέρους αυτού
σε Κυβερνητικό
Χημείο.

(α) Σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στο Μέρος I του Δεύτερου Παραρτήματος, με σκοπό τον προσδιορισμό υπολειμμάτων διφαινυλίου, ορθοφαι-

Δεύτερο
Παράρτημα,
Μέρος I.

νυλοφαινόλης και ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου στο φλοιό των εσπεριδοειδών και

Δεύτερο
Παράρτημα,
Μέρος 2.

(β) σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στο Μέρος 2 του Δεύτερου Παραρτήματος, με σκοπό τον προσδιορισμό υπολειμμάτων του διφαινυλίου στα εσπεριδοειδή και

Δεύτερο
Παράρτημα,
Μέρος 3.

(γ) σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στο Μέρος 3 του Δεύτερου Παραρτήματος, με σκοπό τον προσδιορισμό υπολειμμάτων ορθοφαινυλοφαινόλης και ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου στα εσπεριδοειδή.

(2) Μετά το πέρας της αναφερόμενης στην παράγραφο (1) ανάλυσης ή εξέτασης, ο Κυβερνητικός Χημικός εκδίδει, και αποστέλλει ή παραδίδει στον εξουσιοδοτημένο λειτουργό, ο οποίος υπέβαλε το δείγμα ή μέρος του δείγματος, πιστοποιητικό ή ανάλογα με την περίπτωση, εργαστηριακή έκθεση, σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στις παραγράφους (β) και (δ) του εδαφίου (3) του άρθρου 15 του Νόμου, το οποίο πιστοποιητικό ή εργαστηριακή έκθεση καταδεικνύει το αποτέλεσμα της διενεργηθείσας ανάλυσης ή εξέτασης.

(3) Το εδάφιο (4) του άρθρου 15 του Νόμου εφαρμόζεται αναφορικά με κάθε πιστοποιητικό και έκθεση που εκδίδεται δυνάμει της παραγράφου (2).

(4) Κάθε πρόσωπο, υπό την ευθύνη του οποίου Κυβερνητικό Χημείο λειτουργεί, λαμβάνει τα δέοντα μέτρα για τη συμμόρφωση κάθε Κυβερνητικού Χημικού, ο οποίος υπηρετεί ή εργάζεται στο εν λόγω Κυβερνητικό Χημείο, με τις παραγράφους (1) και (2).

Εναρξη
ισχύος των
παρόντων
Κανονισμών.

5.—(1) Με την επιφύλαξη της παραγράφου (2), οι παρόντες Κανονισμοί τίθενται σε ισχύ κατά την ημερομηνία της δημοσίευσής τους στην Επίσημη Εφημερίδα της Δημοκρατίας.

(2) Ο Κανονισμός 4 τίθεται σε ισχύ κατά την 1η Ιανουαρίου του έτους 2003.

ΠΡΩΤΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

(Κανονισμός 3)

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΟΥΣ

1. Το άρθρο 16 του Νόμου δεν εφαρμόζεται.

2. Σε περίπτωση που εξουσιοδοτημένος λειτουργός παίρνει, δυνάμει του άρθρου 14 του Νόμου, δείγμα εσπεριδοειδούς, με σκοπό να το υποβάλει σε Κυβερνητικό Χημικό για ανάλυση ή εξέταση:

(α) Διενεργεί τη δειγματοληψία σύμφωνα με επιστημονικές μεθόδους οι οποίες διασφαλίζουν ότι κάθε λαμβανόμενο δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό της υπό έλεγχο παρτίδας και οι οποίες καθορίζονται από το Διευθυντή του Τμήματος Ιατρικών Υπηρεσιών και Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας και

(β) λαμβάνει τα δέοντα μέτρα ώστε το δείγμα, το οποίο θα υποβάλει σε Κυβερνητικό Χημικό, πληροί τα ακόλουθα:

(i) Σε περίπτωση που τα υπό έλεγχο εσπεριδοειδή είναι συσκευασμένα (σε ξύλινα κιβώτια, χαρτοκιβώτια ή ανάλογες μονάδες συσκευασίας), το δείγμα πρέπει να είναι συγκεκριμένης ποσότητας και να λαμβάνεται από συγκεκριμένο αριθμό μονάδων συσκευασίας ανά παρτίδα, σύμφωνα με τον ακόλουθο Πίνακα:

Αριθμός μονάδων συσκευασίας ανά παρτίδα:	Μέχρι και 20	Από 21 μέχρι και 500	Από 501 μέχρι και 1000	Ανω των 1000
Ελάχιστος αριθμός μονάδων συσκευασίας από τις οποίες λαμβάνεται δείγμα:	1	2	3	4
Ποσότητα, σε χιλιόγραμμα, εσπεριδοειδούς, η οποία λαμβάνεται ως δείγμα ανά μονάδα συσκευασίας:	2	2	2	2

- (ii) Σε περίπτωση που τα υπό έλεγχο εσπεριδοειδή είναι χύμα, το δείγμα πρέπει να είναι συγκεκριμένης ποσότητας ανά συγκεκριμένη ποσότητα παρτίδας, σύμφωνα με τον ακόλουθο Πίνακα:

Ποσότητα παρτίδας σε χιλιόγραμμα:	Μέχρι και 20	Από 21 μέχρι και 500	Ανω των 500
Ποσότητα, σε χιλιόγραμμα, εσπεριδοειδών η οποία λαμβάνεται ως δείγμα:	2	4	8

- (γ) παίρνει ακόμα δύο δείγματα, σύμφωνα με τα διαλαμβανόμενα στην υποπαράγραφο (β), τα οποία είναι πανομοιότυπα με το δείγμα το οποίο θα υποβάλει στον Κυβερνητικό Χημικό και

- (δ) εισάγει έκαστο δείγμα που πήρε, βάσει της παρούσας παραγράφου, σε ερμητικά κλειστή συσκευασία την οποία σφραγίζει και

- (i) δίνει μία συσκευασία στο πρόσωπο που κατέχει ή κατά οποιοδήποτε τρόπο δικαιούται σε φύλαξη ή έλεγχο των εσπεριδοειδών από τα οποία λαμβάνεται το δείγμα, ή στον αντιπρόσωπο του εν λόγω προσώπου και

- (ii) υποβάλει το ταχύτερο δυνατό μία συσκευασία στον Κυβερνητικό Χημικό και

- (iii) κρατά μία συσκευασία για μελλοντική σύγκριση.

3. Κάθε πρόσωπο, το οποίο αναφέρεται στην παράγραφο 2(δ)(i) και στο οποίο δίνεται μία συσκευασία με δείγμα δυνάμει της εν λόγω παραγράφου, έχει τα δικαιώματα που χορηγούνται από τα εδάφια (1) και (5) του άρθρου 15 του Νόμου.

4. Στην παράγραφο 2, ο όρος "παρτίδα" σημαίνει μέρος του φορτίου, το οποίο μέρος παρουσιάζει τα ίδια χαρακτηριστικά, όπως ποικιλία, βαθμό ωριμότητας και τύπο συσκευασίας.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

(Κανονισμός 4)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΚΥΒΕΡΝΗΤΙΚΟΥΣ ΧΗΜΙΚΟΥΣ
Ή ΠΡΟΣΩΠΑ ΥΠΟ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΜΕΣΗ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥΣ,
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ Ή ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Μέρος 1

Μέθοδος ποιοτικού προσδιορισμού υπολειμμάτων διφαινυλίου,
ορθοφαινυλοφαινόλης και ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου
στο φλοιό εσπεριδοειδών.

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής—

Η μέθοδος που περιγράφεται πιο κάτω επιτρέπει την εξακρίβωση της παρουσίας υπολειμμάτων διφαινυλίου, ορθοφαινυλοφαινόλης (OPP) ή ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου στο φλοιό εσπεριδοειδών. Το όριο ευαισθησίας είναι, κατ' απόλυτη τιμή, της τάξεως των 5mg για το διφαινύλιο και 1mg για το OPP ή το ορθοφαινυλοφαινολικό νάτριο, τα οποία ισοδυναμούν, αντίστοιχα, με 5mg διφαινυλίου (5 ppm) και 1 mg OPP(1ppm) στο φλοιό 1kg εσπεριδοειδών.

Η κατεργασία των εσπεριδοειδών με τα προαναφερθέντα προϊόντα επιφέρει την παρουσία υπολειμμάτων, κατά κύριο λόγο, στο φλοιό των φρούτων. Ο προσδιορισμός αυτών των υπολειμμάτων μέσα σε ολόκληρα τα φρούτα βάσει των καθοριζόμενων στα Μέρη 2 και 3 μεθόδων, δεν είναι, ως εκ τούτου, αναγκαίος, παρά μόνο στην περίπτωση που η παρουσία τους έχει πιστοποιηθεί στο φλοιό.

2. Αρχή της μεθόδου—

Οι φλοιοί εκχυλίζονται με διχλωρομεθάνιο σε όξινο περιβάλλον. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται και γίνεται χρωματογραφία λεπτής στιβάδας πάνω σε silica gel. Η παρουσία διφαινυλίου, ορθοφαινυλοφαινόλης ή ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου γίνεται φανερή με φθορισμό και χρωστικές αντιδράσεις.

3. Αντιδραστήρια—

- (α) Κυκλοεξάνιο A.R.
- (β) Διχλωρομεθάνιο A.R.
- (γ) Υδροχλωρικό οξύ 25% (w/v).
- (δ) Silica gel GF 254 Merck ή ισοδύναμο.
- (ε) Διάλυμα σε ακετόνη της 2,4,7-τρινιτροφλουορενόνης (Fluka, B.D.H. ή ισοδύναμη) 0,5% (TNF).
- (στ) Αιθανολικό διάλυμα 2,6-διβρωμο-βενζοκινονο-4-χλωρο-ιμιδίου 0,1% (μέγιστη διάρκεια διατήρησης: μια εβδομάδα σε ψυγείο).
- (ζ) Συμπυκνωμένο διάλυμα αμμωνίας d: 0,9.
- (η) Πρότυπο διάλυμα καθαρού διφαινυλίου 1% μέσα σε κυκλοεξάνιο.
- (θ) Πρότυπο διάλυμα καθαρής ορθοφαινυλοφαινόλης 1% μέσα σε κυκλοεξάνιο.

4. Όργανα—

- (α) Αναμικτήρας (μίξερ).
- (β) Σφαιρική φιάλη των 250ml έσφυρσιμένη στο λαιμό και με κάθετο ψυκτήρα.
- (γ). Συμπυκνωτήρας υπό ελαττωμένη πίεση.

- (δ) Μικροσιφώνια.
- (ε) Συσκευή χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με πλάκες 20X20 cm.
- (στ) Λυχνία U.V. (254 nm): η ένταση πρέπει να είναι τέτοια, ώστε μια κηλίδα των 5 μg διφαινυλίου να μπορεί να διακρίνεται.
- (ζ) Ψεκάστήρας αντιδραστηρίων.
- (η) Πυριαντήριο.

5. Τρόπος εργασίας—

- (α) Προετοιμασία του δείγματος και εκχύλιση:

Τα φρούτα που αποτελούν το σύνολο του δείγματος πού ελήφθη για τον έλεγχο, κόπτονται στα δύο. Το ένα μισό κάθε φρούτου προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων διφαινυλίου και/ή ορθοφαινυλοφαινόλης. Λαμβάνονται από τα άλλα μισά τόσα μέρη φλοιού, ώστε να έχουμε δείγμα 80 γραμμαρίων περίπου. Αυτά τα μέρη τεμαχίζονται, συνθλίβονται στο μίξερ και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml, στην οποία προστίθενται 1 ml υδροχλωρικού οξέος 25% και 100 ml διχλωρομεθανίου. Το μείγμα θερμαίνεται υπό κάθετο ψυκτήρα επί δέκα λεπτά. Αφού ψυχθεί και εκπλυθεί ο ψυκτήρας με 5ml περίπου διχλωρομεθανίου, το μίγμα διηθείται από πτυχωτό ηθμό. Το διάλυμα μεταφέρεται στο συμπυκνωτήρα και προστίθενται σε αυτό μερικές ελαφρόπετρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση στη θερμοκρασία των 60°C μέχρι να ληφθεί ένας τελικός όγκος 10 ml περίπου. Εάν χρησιμοποιείται περιστροφικός συμπυκνωτήρας, η σφαιρική φιάλη πρέπει να συγκρατείται σε σταθερή θέση για ν' αποφεύγονται απώλειες σε διφαινύλιο με το σχηματισμό ενός υμένα αυτού του προϊόντος στο άνω τοίχωμα της σφαιρικής φιάλης.

- (β) Χρωματογραφία—

Τοποθετούνται σε αναμικτήρα 30 gr silica gel και 60 ml νερό. Αναμιγνύονται επί ένα λεπτό, και το μίγμα κατόπιν στρώνεται σε 5 χρωματογραφικές πλάκες και απλώνεται για να σχηματισθεί ένα στρώμα πάχους 0,250 χιλιοστών του μέτρου περίπου. Οι στρωμένες πλάκες υποβάλλονται επί 15 λεπτά σε ρεύμα θερμού αέρα και μετά τοποθετούνται σε πυριαντήριο θερμοκρασίας 110°C για 30 λεπτά.

Αφού ψυχθούν, κάθε πλάκα διαιρείται σε λωρίδες πλάτους 2 cm με παράλληλες γραμμές που εισχωρούν στην επίστρωση μέχρι της επιφάνειας της πλάκας. 50 μl από το υπό ανάλυση ή εξέταση εκχύλισμα τοποθετείται, ως μια σειρά επαλλήλων σταγόνων, σε κάθε λωρίδα, σε απόσταση περίπου 1,5 cm από την άκρη της. Μία τουλάχιστο λωρίδα φυλάσσεται για τους μάρτυρες που αποτελούνται από μία απόθεση του 1 μl (δηλαδή 10 μg) προτύπων διαλυμάτων διφαινυλίου και ορθοφαινυλοφαινόλης. Οι χρωματογραφικές πλάκες αναπτύσσονται με τη βοήθεια μείγματος κυκλοεξανίου και διχλωρομεθανίου (25 : 95) σε θαλάμους που έχουν προηγουμένως επιστρωθεί εσωτερικά με διηθητικό χάρτη.

- (γ) Ανίχνευση και πιστοποίηση—

Η παρουσία διφαινυλίου και ορθοφαινυλοφαινόλης χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση κηλίδων στο υπεριώδες φως (254 nm). Επειδή το ορθοφαινυλοφαινολικό νάτριο έχει μετατραπεί σε ορθοφαινυλοφαινόλη κατά τη διάρκεια της εκχύλισης σε όξινο περιβάλλον, η

παρουσία του δε διαφοροποιείται από εκείνη της ορθοφαινυλοφαινόλης. Η πιστοποίηση των προϊόντων γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο:

- (i) Το διφαινύλιο δίνει μια κίτρινη κηλίδα στο φως της ημέρας μετά από ψεκασμό με διάλυμα TNF.
- (ii) η ορθοφαινυλοφαινόλη δίνει μια κυανή κηλίδα, μετά από ψεκασμό με διάλυμα 2,6-διβρωμο-βενζοκινονο-4-χλωρο-ιμιδίου, ακολουθούμενο από γρήγορο πέρασμα σε ρεύμα θερμού αέρα και στη συνέχεια έκθεση σε ατμόσφαιρα κορεσμένη με αμμωνία.

Μέρος 2

Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού υπολειμμάτων διφαινυλίου στα εσπεριδοειδή.

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής—

Η μέθοδος που περιγράφεται κατωτέρω επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων διφαινυλίου στα εσπεριδοειδή (ολόκληρα φρούτα). Το περιθώριο λάθους των αποτελεσμάτων είναι $\pm 10\%$ για περιεκτικότητες σε διφαινύλιο μεγαλύτερες των 10 mg ανά χιλιόγραμμο φρούτων (10 ppm).

Η κατεργασία εσπεριδοειδών με διφαινύλιο επιφέρει την παρουσία σχετικών υπολειμμάτων, κατά κύριο λόγο, στο φλοιό των φρούτων. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός αυτών των υπολειμμάτων, βάσει της ακόλουθης μεθόδου, σε ολόκληρα τα φρούτα, διενεργείται μόνο όταν η παρουσία τους έχει πιστοποιηθεί στο φλοιό, βάσει της μεθόδου που καθορίζεται στο Μέρος 1.

2. Αρχή της μεθόδου—

Ύστερα από απόσταξη σε όξινο περιβάλλον και εκχύλιση με κυκλοεξάνιο, το εκχύλισμα χρωματογραφείται σε λεπτή στιβάδα πάνω σε silica gel. Το χρωματογράφημα αναπτύσσεται, το διφαινύλιο εκλούεται και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικώς στα 248 nm.

3. Αντιδραστήρια—

- (α) Πυκνό θειικό οξύ.
- (β) Αντιαφριστικό γαλάκτωμα με βάση τη σιλικόνη.
- (γ) Κυκλοεξάνιο A.R.
- (δ) Εξάνιο A.R.
- (ε) Αιθανόλη A.R.
- (στ) Άνυδρο θειικό νάτριο.
- (ζ) Silica gel GF 254 Merck ή ισοδύναμο.
- (η) Πρότυπο διάλυμα καθαρού διφαινυλίου 1% μέσα σε κυκλοεξάνιο: αραιώσή του με κυκλοεξάνιο, ώστε να ληφθούν τα τρία ακόλουθα διαλύματα:
 - (i) 0,6 μg / μl
 - (ii) 1 μg / μl
 - (iii) 1,4 μg / μl

4. Οργανα—

- (α) Αναμικτήρας (μίξερ) 1 λίτρου.

- (β) Σφαιρική φιάλη αποστάξεως των 2 λίτρων με τροποποιημένο διαχωριστή τύπου Clevenger (βλέπε σχήμα του Μέρους 4) και με κάθετο ψυκτήρα.
- (γ) Ογκομετρική φιάλη των 10 ml.
- (δ) Μικροσιφώνια των 50 ml.
- (ε) Συσκευή χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με πλάκες των 20X20cm.
- (στ) Πυριαντήριο.
- (ζ) Φυγόκεντρος με κωνικούς υποδοχείς των 15ml.
- (η) Φασματοφωτόμετρο U.V.

5. Τρόπος εργασίας—

- (α) Προετοιμασία και εκχύλιση του δείγματος—

Τα φρούτα που αποτελούν το σύνολο του υπό έλεγχο δείγματος κόβονται στα δυο. Το ένα μισό κάθε φρούτου προορίζεται για τον ποιοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων διφαινυλίου, OPP ή ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου. Τα άλλα μισά συγκεντρώνονται, αλέθονται σε μύλο ή συνθλίβονται μέχρι να ληφθεί ένα ομογενές μίγμα. Λαμβάνονται από το μίγμα αυτό δυο τουλάχιστον υπο-δείγματα των 200 γραμμαρίων, στα οποία εφαρμόζεται η ακόλουθη μέθοδος. Κάθε υπο-δείγμα τοποθετείται σε αναμικτήρα (μίξερ) με 100ml νερού και ανακατεύεται σε χαμηλή ταχύτητα επί μερικά δευτερόλεπτα. Προστίθεται νερό σε ποσότητα τέτοια, ώστε ο όγκος του μίγματος να φθάσει τα 3/4 της χωρητικότητας του αναμικτήρα.

Το μίγμα ανακατεύεται στη συνέχεια με μεγάλη ταχύτητα περί τα 5 λεπτά. Ο πολτός που λαμβάνεται κατ' αυτό τον τρόπο μεταφέρεται στη φιάλη αποστάξεως των 2 λίτρων. Ο αναμικτήρας ξεπλένεται με νερό και αυτό το νερό εκπλύσεως προστίθεται στο περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης. (Το σύνολο του νερού που χρησιμοποιείται για τη σύνθλιψη και το ξέπλυμα είναι 1 λίτρο).

Στο μίγμα προστίθενται 2ml θειικού οξέος, 1ml αντιαφριστικό γαλάκτωμα και μερικές ελαφρόπετρες. Ο διαχωριστήρας και ο ψυκτήρας συνδέονται με τη σφαιρική φιάλη. Εισάγεται στο διαχωριστήρα απεσταγμένο νερό, μέχρις ότου το επίπεδο του νερού ξεπεράσει καθαρά την κάτω σύνδεση του πλάγιου σωλήνα επιστροφής και στη συνέχεια 7 ml κυκλοεξάνιο. Αποστάζεται επί δυο ώρες περίπου. Κατόπιν το περιεχόμενο του διαχωριστήρα συλλέγεται στην ογκομετρική φιάλη των 10 ml, ο διαχωριστήρας ξεπλένεται με 1,5 ml περίπου κυκλοεξάνιο, το διάλυμα του εκπλύματος προστίθεται στο περιεχόμενο της φιάλης και ο όγκος συμπληρώνεται με κυκλοεξάνιο. Τελικά προστίθεται λίγο άνυδρο θειικό νάτριο και το μείγμα αναταράσσεται.

- (β) Χρωματογραφία—

Τίθενται σε ένα αναμικτήρα (μίξερ) 30g silica gel και 60 ml νερό και αναμειγνύονται επί ένα λεπτό. Στη συνέχεια το μίγμα χύνεται σε 5 χρωματογραφικές πλάκες και απλώνεται για να σχηματισθεί ένα στρώμα πάχους 0,250 χιλιοστών του μέτρου περίπου. Οι κατ' αυτό τον τρόπο επικαλυμμένες πλάκες υποβάλλονται επί 15 λεπτά σε ρεύμα θερμού αέρα και τοποθετούνται σε πυριαντήριο, όπου διατηρούνται επί 30 λεπτά σε 110°C. Μετά την ψύξη, διαιρείται κάθε πλάκα σε 4 λωρίδες πλάτους 4,5 cm με παράλληλες γραμμές που εισχωρούν στην επικά-

λυση μέχρι την επιφάνεια της πλάκας. 50 μl από το προς ανάλυση ή εξέταση εκχύλισμα τίθενται, ως μια σειρά επαλλήλων σταγόνων, σε μια από τις λωρίδες, σε απόσταση περίπου 1,5 cm από την άκρη της πλάκας. Σε κάθε μια από τις άλλες τρεις λωρίδες τίθενται, κατά τον ίδιο τρόπο, 50 μl από τα πρότυπα διαλύματα (i), (ii) και (iii), που αντιστοιχούν σε δόσεις διφαινυλίου των 30, 50 και 70 μl.

Εάν οι αναλύσεις ή εξετάσεις εκτελεστούν στη σειρά, μπορεί να παραληφθεί η απόθεση σε κάθε πλάκα των προτύπων διαλυμάτων και να γίνει αναφορά για την καμπύλη αναφοράς, στο μέσο όρο των τιμών που λήφθηκαν από πέντε τουλάχιστο πλάκες με τις ίδιες δόσεις προτύπων διαλυμάτων.

(γ) Ανάπτυξη χρωματογραφημάτων και έκλυση—

Τα χρωματογραφήματα αναπτύσσονται σε ύψος 17 εκ. με εξάνιο, μέσα σε θαλάμους που έχουν προηγουμένως επιστρώθει εσωτερικά με διηθητικό χάρτη. Οι πλάκες ξηραίνονται στον αέρα. Οι ζώνες στις οποίες υπάρχει διφαινύλιο εντοπίζονται σε φως U.V. στα 254nm και περιγράφονται με τετράγωνα ίσης επιφάνειας.

Οι επιφάνειες που περιορίστηκαν έτσι ξύνονται αμέσως με μία σπάτουλα σε όλο το βάθος του υποστρώματος. Το διφαινύλιο εκχυλίζεται με 10 ml αιθανόλης επί 10 λεπτά, αναδεύοντας αρκετές φορές. Το μείγμα μεταφέρεται στους σωλήνες φυγοκέντρισης και φυγοκεντρείται επί 5 λεπτά στις 2500 στροφές ανά λεπτό.

Λαμβάνεται κατά τον ίδιο τρόπο μία ζώνη μάρτυρα των ιδίων διασάσεων. Σε περίπτωση που οι αναλύσεις ή εξετάσεις γίνονται στη σειρά, αυτή η ζώνη λαμβάνεται από μια παρθένα λωρίδα της πλάκας. Στην περίπτωση ανεξάρτητων αναλύσεων ή εξετάσεων, η εν λόγω ζώνη λαμβάνεται από μία λωρίδα κατειλημμένη από πρότυπο διάλυμα κάτω από τη ζώνη που περιέχει το διφαινύλιο.

(δ) Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός—

Το υγρό που επιπλέει μεταγγίζεται μέσα στις κυψελίδες του φασματοφωτόμετρου και η απόσβεση προσδιορίζεται στα 248 nm, συγκρίνοντας με ένα πρότυπο εκχύλισμα που προέρχεται από μια χρωματογραφική ζώνη χωρίς διφαινύλιο.

6. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων—

Σχεδιάζεται μια καμπύλη αναφοράς, λαμβάνοντας αντιστοίχως ως συντεταγμένες τις δόσεις διφαινυλίου των 30, 50 και 70 μg και τις αντίστοιχες τιμές αποσβέσεως που προσδιορίστηκαν στο φασματοφωτόμετρο. Η καμπύλη που λαμβάνεται κατ' αυτό τον τρόπο είναι μια ευθεία που διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Αυτή η γραφική παράσταση επιτρέπει την απευθείας ανάγνωση σε ppm των περιεκτικοτήτων των δειγμάτων σε διφαινύλιο, με βάση τις τιμές αποσβέσεως των εκχυλισμάτων τους.

Μέρος 3

Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού υπολειμμάτων ορθοφαινυλοφαινόλης και ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου στα εσπεριδοειδή.

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής—

Η μέθοδος που περιγράφεται κατωτέρω επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων ορθοφαινυλοφαινόλης (OPP) και ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου στα εσπεριδοειδή (ολόκληρα φρούτα). Τα αποτελέ-

σμάτα περιέχουν ένα σφάλμα του οποίου η μέση τιμή βρίσκεται μεταξύ 10 και 20% για μία περιεκτικότητα σε OPP ή ορθοφαινυλοφαινολικό νάτριο της τάξεως των 12 ppm.

Η κατεργασία εσπεριδοειδών με OPP ή ορθοφαινυλοφαινολικό νάτριο, επιφέρει την παρουσία σχετικών υπολειμμάτων, κατά κύριο λόγο στο φλοιό των φρούτων. Ως εκ τούτου, ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των υπολειμμάτων, βάσει της ακόλουθης μεθόδου, σε ολόκληρα τα φρούτα, διενεργείται μόνο εάν η παρουσία τους έχει πιστοποιηθεί στο φλοιό, βάσει της μεθόδου που καθορίζεται στο Μέρος 1.

2. Αρχή της μεθόδου—

Υστερα από απόσταξη σε όξινο περιβάλλον και εκχύλισμα με δι-ισοπενθυλικό αιθέρα, το εκχύλισμα καθαρίζεται και υποβάλλεται σε κατεργασία με διάλυμα 4-αμινο-2,3 διμεθυλ-1-φαινυλ-3-πυραζολιν-5-όνη (=4-αμινοαντιπυρίνης) (4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one (=4-aminoantipyrine)). Αναπτύσσεται ένας ερυθρός χρωματισμός, του οποίου η ένταση μετρείται με φασματοφωτομέτρηση στα 510nm.

3. Αντιδραστήρια—

- (α) Φωσφορικό οξύ 70%.
 - (β) Αντιαφριστικό γαλάκτωμα με βάση τη σιλικόνη.
 - (γ) Δι-ισοπενθυλικός αιθέρας A.R.
 - (δ) Καθαρό κυκλοεξάνιο: αναδεύεται τρεις φορές με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 4%, ξεπλένεται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό.
 - (ε) Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 4%.
 - (στ) Ρυθμιστικό διάλυμα με pH 10,4: τοποθετούνται, σε μια ογκομετρική φιάλη των δυο λίτρων, 6,64 g βορικό οξύ, 8,00 g χλωριούχο κάλιο και 93,1 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 1N. Αναδεύονται και συμπληρώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή.
 - (ζ) Αντιδραστήριο I: διαλύεται 1,0g 4-αμινο-2,3-διμεθυλ-1-φαινυλ-3-πυραζολιν-5-όνη (=4-αμινοαντιπυρίνη) (4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one (=4-aminoantipyrine)) σε 100 ml απεσταγμένο νερό.
- Αντιδραστήριο II: διαλύονται 2 g σιδηροκυανιούχου καλίου σε 100 ml απεσταγμένο νερό. Τα αντιδραστήρια I και II πρέπει να διατηρούνται σε σκοτεινές γυάλινες φιάλες και δεν είναι σταθερά παρά μόνο για 14 ημέρες περίπου.
- (η) Silica gel.
 - (θ) Πρότυπο διάλυμα: διαλύονται 10 mg καθαρής OPP σε 1 ml NaOH 0,1 N, συμπληρώνονται μέχρι τα 100 ml με διάλυμα βορικού νατρίου 0,2 m (1 ml = 100 μg). Για το πρότυπο διάλυμα, διαλύεται 1 : 10 με το ρυθμιστικό διάλυμα.

4. Οργανα—

- (α) Μύλος αλέσεως ή συνθλίπτης.
- (β) Αναμικτήρας (μίξερ).
- (γ) Φιάλη αποστάξεως 1 λίτρου με τροποποιημένο διαχωριστήρα τύπου Clevenger (βλέπε σχήμα Μέρους 4) και με κάθετο ψυκτήρα (νερού). Μέρος 4.
- (δ) Λουτρό υπερύθρων.
- (ε) Χοάνη διαχωρισμού των 200 ml.
- (στ) Ογκομετρικοί κύλινδροι των 25 και 100 ml.

- (ζ) Ογκομετρικές φιάλες των 25 και 100 ml.
- (η) Σιφώνια του 1 ως 10 ml.
- (θ) Σιφώνια ογκομετρικά των 0,5 ml.
- (ι) Φασματοφωτόμετρο με κυψελίδες των 5 cm.

5. Τρόπος εργασίας—

Τα φρούτα που αποτελούν το σύνολο του δείγματος που ελήφθη για έλεγχο, κόβονται στα δυο. Το ένα μισό κάθε φρούτου προορίζεται για ποιοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων του διφαινυλίου, του OPP ή του ορθοφαινυλοφαινολικού νατρίου. Τα άλλα μισά συλλέγονται, αλέθονται σε μύλο ή συνθλίβονται, μέχρις ότου γίνουν ένα ομογενές μείγμα. Λαμβάνονται από το μίγμα τουλάχιστο δυο υπο-δείγματα των 250 g, στα οποία εφαρμόζεται η ακόλουθη μέθοδος.

Κάθε υπο-δείγμα τοποθετείται σε αναμικτήρα με 500 ml νερό και συνθλίβεται, μέχρις ότου γίνει ένας ρευστός ομογενής πολτός, στον οποίο τα ελαιώδη κύτταρα δεν είναι πλέον διακριτά. Λαμβάνονται, ανάλογα με την πιθανολογούμενη περιεκτικότητα σε OPP, 150 έως 300g πολτού και τοποθετούνται στη φιάλη αποστάξεως του ενός λίτρου με τη βοήθεια ποσότητας νερού, ώστε το μίγμα να φθάσει στα 500 g μέσα στη φιάλη.

Αφού προστεθούν 10 ml φωσφορικού οξέος 70%, μερικές ελαφρόπετρες και 0,5 ml αντιαφριστικό γαλάκτωμα, ο διαχωριστήρας και ο ψυκτήρας συνδέονται στη σφαιρική φιάλη. Εισάγονται στο διαχωριστήρα 10 ml δι-ισοπενθυλικός αιθέρας και θερμαίνεται σιγά η φιάλη μέσα στο λουτρό υπε-ρύθρων, αποφεύγοντας το ψήσιμο του πολτού ή το σχηματισμό αφρού. Μετά από απόσταξη, επί 6 ώρες περίπου, το περιεχόμενο του διαχωρι-στήρα χύνεται στη χοάνη διαχωρισμού των 200 ml, ο διαχωριστήρας και ο ψυκτήρας ξεπλένονται με 60 ml κυκλοεξάνιο και μετά με 60 ml νερό. Τα υγρά εκπλύσεως προστίθενται στο περιεχόμενο της χοάνης διαχωρισμού. Το μείγμα αναταράσσεται δυνατά και, αφού χωριστούν οι φάσεις, η υδατική φάση διαχωρίζεται και αφαιρείται.

Για να εκχυλιστεί το OPP, η οργανική φάση αναταράσσεται δυνατά 5 φορές, κάθε φορά για 3 λεπτά με 10 ml υδροξειδίου του νατρίου 4%. Τα αλκαλικά διαλύματα συγκεντρώνονται, εξουδετερώνονται σε pH 9-10 με φωσφορικό οξύ, παρουσία χάρτου φαινολοφθαλεΐνης, και συμπληρώνονται έως τα 100 ml με απεσταγμένο νερό. Προστίθεται μια μικρή ποσότητα silica gel για να διανυγαστεί το διάλυμα που παρουσιάζει ελαφρό θόλωμα, το διάλυμα αναταράσσεται και διηθείται από ξηρό φίλτρο με πολύ λεπτούς πόρους. Εφόσον είναι γνωστό ότι μεγαλύτερη ακρίβεια και πιστότητα στην ανάπτυξη του χρωματισμού επιτυγχάνεται με ποσότητες OPP που περιλαμβάνονται μεταξύ 10 και 70 μg, λαμβάνεται με τη βοήθεια ενός σιφωνίου μία ανάλογη ποσότητα από 0,5 έως 10 ml διαλύματος, έχοντας υπόψη τις ποσότητες OPP που αναμένονται να βρεθούν. Αυτό το διάλυμα τοποθετείται μέσα σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 ml, προστίθεται 0,5 ml από το αντιδραστήριο I, 10 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα και ακολούθως 0,5 ml από το αντιδραστήριο II. Το μείγμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το ρυθμιστικό διάλυμα και αναταράσσεται δυνατά.

Υστερα από 5 λεπτά μετρείται στο φασματοφωτόμετρο η απόσβεση του ερυθρού χρωματισμού στα 510 nm συγκρίνοντάς το με ένα δείγμα που δεν περιέχει εκχύλισμα. Η ένταση του χρωματισμού δε μεταβάλλεται επί 30 λεπτά. Η εκτίμηση γίνεται σε σχέση με τις τιμές της καμπύλης αναφοράς που έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες με το πρότυπο διάλυμα OPP.

6. Παρατηρήσεις—

Για κάθε ανάλυση συνιστάται να γίνεται ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός εις διπλούν, με διαφορετικούς όγκους εξουδετερουμένου αλκαλικού εκχυλίσματος. Τα εσπεριδοειδή που δεν είναι κατεργασμένα δίνουν με αυτή τη μέθοδο "λευκές τιμές" που μπορούν να φθάσουν τα 0,5 ppm για τα πορτοκάλια και 0,8 ppm για τα λεμόνια.

Μέρος 4

Συσκευή CLEVENGER

