

31998L0064

L 257/14

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

19.9.1998

SMĚRNICE KOMISE 98/64/ES**ze dne 3. září 1998,****kteřou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení aminokyselin, tuků a olachindoxu v krmivech a kterou se mění směrnice 71/393/EHS****(Text s významem pro EHP)**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

vzhledem k tomu, že musí být stanoveny analytické metody Společenství pro kontrolu těchto látek;

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽¹⁾, naposledy pozměněnou Aktem o přistoupení Rakouska, Finska a Švédska, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

vzhledem k tomu, že směrnice 70/373/EHS stanoví, že úřední kontrola krmiv za účelem kontroly, zda krmiva splňují požadavky vyplývající z právních a správních předpisů týkajících se jejich jakosti a složení, se provádí za použití metod odběru vzorků a analýzy platných ve Společenství;

Článek 1

vzhledem k tomu, že směrnice Rady 79/373/EHS ze dne 2. dubna 1979 o uvádění krmných směsí na trh⁽²⁾, naposledy pozměněná směrnicí Komise 97/47/ES⁽³⁾, a směrnice Rady 93/74/EHS ze dne 13. září 1993 o krmivech určených ke zvláštním účelům výživy⁽⁴⁾, naposledy pozměněná směrnicí 96/25/ES⁽⁵⁾, stanoví, že obsah aminokyselin a tuku musí být uveden na označení krmiv;

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu obsahu aminokyselin, tuku a obsahu olachindoxu v krmivech se provádějí za použití metod uvedených v příloze této směrnice.

Článek 2

vzhledem k tomu, že směrnice Rady 70/524/EHS ze dne 23. listopadu 1970 o doplňkových látkách v krmivech⁽⁶⁾, naposledy pozměněná směrnicí Komise 98/19/ES⁽⁷⁾, stanoví, že obsah olachindoxu musí být uveden na označení, pokud je tato látka přidána do krmných směsí;

V příloze směrnice Komise 71/393/EHS se bod „4. Stanovení obsahu tuku“ nahrazuje částí B přílohy této směrnice.

Článek 3

vzhledem k tomu, že druhá směrnice Komise 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv⁽⁸⁾, naposledy pozměněná směrnicí Komise 84/4/EHS⁽⁹⁾, stanoví metody analýzy mimo jiné i pro zjišťování obsahu tuku; že je vhodné uvedené metody upravit;

1. Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. prosince 1998. Uvědomí o nich neprodleně Komisi.

Budou tyto předpisy používat od 1. ledna 1999.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. L 86, 6.4.1979, s. 30.

⁽³⁾ Úř. věst. L 211, 5.8.1977, s. 45.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 237, 22.9.1993, s. 23.

⁽⁵⁾ Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 35.

⁽⁶⁾ Úř. věst. L 270, 14.12.1970, s. 1.

⁽⁷⁾ Úř. věst. L 96, 28.3.1998, s. 39.

⁽⁸⁾ Úř. věst. L 279, 2.12.1971, s. 7.

⁽⁹⁾ Úř. věst. L 15, 18.1.1984, s. 28.

2. Členské státy sdělí Komisi znění hlavních ustanovení vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice.

Článek 5

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 3. září 1998.

Článek 4

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v Úředním věstníku Evropských společenství.

Za Komisi

Franz FISCHLER

člen Komise

PŘÍLOHA

ČÁST A

Stanovení aminokyselin

1. Účel a oblast použití

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu volných (syntetických a přirozených) a vázaných (peptidy vázané a volné) aminokyselin v krmivech za použití analyzátoru aminokyselin. Metoda je použitelná pro tyto aminokyseliny: cyst(e)in, methionin, lysin, threonin, alanin, arginin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, glycin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, serin, tyrosin a valin.

Tato metoda nerozlišuje mezi solemi aminokyselin a nemůže také u aminokyselin rozlišovat mezi formami D a L. Není použitelná pro stanovení tryptofanu nebo hydroxy analogů aminokyselin.

2. Princip

2.1 Volné aminokyseliny

Volné aminokyseliny se extrahují zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Současně extrahované dusíkaté makromolekuly se srážejí kyselinou sulfosalicylovou a odstraňují se filtrací. Zfiltrovaný roztok se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují iontoměničovou chromatografií a stanoví se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm.

2.2 Vázané aminokyseliny

Zvolený proces závisí na stanovovaných aminokyselinách. Cyst(e)in a methionin musí být před hydrolyzou oxidovány na kyselinu cysteovou a na methioninsulfon. Tyrosin se musí stanovovat v hydrolyzátech neoxidovaných vzorků. Ostatní aminokyseliny uvedené v bodě 1 mohou být zjišťovány buď v oxidovaném nebo v neoxidovaném vzorku.

Oxidace se provádí při 0 °C směsí kyseliny permravnčí a fenolu. Nadbytečné oxidační činidlo se rozloží dvojsíranem sodným. Oxidovaný nebo neoxidovaný vzorek se hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou ($c = 6 \text{ mol/l}$) po 23 hodin. Hydrolyzát se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují iontoměničovou chromatografií a stanovují se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm (440 nm pro prolin).

3. Činidla

Musí být použita dvakrát destilovaná voda nebo voda obdobné jakosti (vodivost $< 10 \text{ } \mu\text{S}$).

- 3.1 peroxid vodíku, $w = 30 \text{ } \%$
- 3.2 kyselina mravnčí, $w = 98\text{--}100 \text{ } \%$
- 3.3 fenol
- 3.4 dvojsíran sodný
- 3.5 hydroxid sodný
- 3.6 kyselina 5-sulfosalicylová, dihydrát
- 3.7 kyselina chlorovodíková o hustotě přibližně $1,18 \text{ g/ml}$
- 3.8 citronan sodný, dihydrát
- 3.9 2,2-thiodiethanol (thiodiglykol)
- 3.10 chlorid sodný
- 3.11 ninhydrin
- 3.12 petrolether, bod varu $40\text{--}60 \text{ } ^\circ\text{C}$
- 3.13 norleucin nebo jiná sloučenina použitelná jako vnitřní standard
- 3.14 dusík – plyn ($< 10 \text{ ppm}$ kyslíku)

- 3.15 1-oktanol
- 3.16 aminokyseliny
- 3.16.1 standardní látky uvedené v bodě 1; čisté sloučeniny neobsahující krystalizační vodu. Vysuší se ve vakuu nad P_2O_5 nebo H_2SO_4 týden před použitím
- 3.16.2 kyselina cysteová
- 3.16.3 methioninsulfon
- 3.17 hydroxid sodný, roztok $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
300 g NaOH (3.5) se rozpustí ve vodě a doplní do 1 litru.
- 3.18 hydroxid sodný, roztok $c = 1 \text{ mol/l}$:
40 g NaOH (3.5) se rozpustí ve vodě a doplní do 1 litru.
- 3.19 roztok kyseliny mravenčí a fenolu:
Smíchá se 889 g kyseliny mravenčí (3.2) se 111 g vody a přidá se 4,73 g fenolu (3.3).
- 3.20 hydrolyzační směs, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ s přídavkem 1 g fenolu/l:
K 492 ml HCl (3.7) se přidá 1 g fenolu (3.3) a doplní se vodou do 1 litru.
- 3.21 extrakční směs, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ s přídavkem 2% thiodiglykolu:
8,2 ml HCl (3.7) se rozředí přibližně 900 ml vody, přidá se 20 ml thiodiglykolu (3.9) a doplní vodou na 1 litr (3.7 a 3.9 se nesmí smíchat přímo).
- 3.22 kyselina 5-sulfosalicylová, $\beta = 6 \%$:
60 g kyseliny 5-sulfosalicylové (3.6) se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.
- 3.23 oxidační směs (kyselina permravenčí – fenol):
V malé kádince se smíchá 0,5 ml peroxidu vodíku (3.1) s 4,5 ml roztoku kyseliny mravenčí s fenolem (3.19); ponechá se v klidu 1 hodinu při 20–30 °C, aby se vytvořila kyselina permravenčí, před přidáním ke vzorku se směs ochladí v lázni s ledovou vodou (15 minut).
Pozor: Je nutno zamezit kontaktu s kůží a používat ochranný oděv.
- 3.24 citronanový tlumivý roztok, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
V přibližně 800 ml vody se rozpustí 19,61 g citronanu sodného (3,8), 5 ml thiodiglykolu (3,9), 1 g fenolu (3,3) a 16,50 ml HCl (3,7). pH se upraví na 2,20. Doplní se vodou na objem 1 litru.
- 3.25 eluční tlumivé roztoky připravované podle podmínek pro použití analyzátor (4.9)
- 3.26 ninhydrinové činidlo připravované podle podmínek pro použití analyzátor (4.9)
- 3.27 Standardní roztoky aminokyselin. Tyto roztoky je nutno uschovávat při teplotě pod 5 °C.
- 3.27.1 zásobní standardní základní roztoky aminokyselin (3.16.1), $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ pro každou aminokyselinu v kyselině chlorovodíkové. Tento roztok lze obdržet i komerčně připravené.
- 3.27.2 zásobní standardní základní roztok kyseliny cysteové a methioninsulfonu, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$
0,2115 g kyseliny cysteové (3.16.2) a 0,2265 g methioninsulfonu se rozpustí (3.16.3) v citronanovém tlumivém roztoku (3.24) v litrové odměrné baňce a doplní se po značku citronanovým tlumivým roztokem. Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 12 měsíců. Tento roztok se nepoužívá, pokud standardní základní roztok (3.27.1) obsahuje kyselinu cysteovou a methioninsulfon.
- 3.27.3 zásobní standardní základní roztok vnitřního standardu, např. norleucinu, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$
0,6560 g norleucinu (3.13) se rozpustí v citronanovém tlumivém roztoku (3.24) v odměrné baňce na 250 ml a doplní se po značku citronanovým tlumivým roztokem. Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 6 měsíců.
- 3.27.4 kalibrační roztok standardních aminokyselin pro použití s hydrolyzáty, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ kyseliny cysteové a methioninsulfonu a $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ u ostatních aminokyselin

Ve 100 ml kádince se rozpustí 2,2 g chloridu sodného (3.10) v 30 ml citronanového tlumivého roztoku (3.24). Přidají se 4,00 ml zásobního standardního základního roztoku aminokyselin (3.27.1), 4,00 ml zásobního standardního základního roztoku kyseliny cysteové a methioninsulfonu (3.27.2) a 0,50 ml zásobního standardního základního roztoku vnitřního standardu (3.27.3), pokud se používá. pH se upraví na 2,20 hydroxidem sodným (3.18).

Roztok se kvantitativně převede do 50 ml odměrné baňky, doplní po značku citronanovým tlumivým roztokem (3.24) a zamíchá se.

Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 3 měsíce.

Viz také poznámky 9.1.

- 3.27.5 kalibrační roztok standardních aminokyselin pro použití s hydrolyzáty, připravenými podle bodu 5.3.3.1 a pro extrakty (5.2). Kalibrační roztok se připravuje podle 3.27.4 s vynecháním chloridu sodného.

Skladujte při teplotě pod 5 °C nejdéle 3 měsíce.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 baňka s kulatým dnem o obsahu 100 nebo 250 ml opatřená zpětným chladičem
- 4.2 nádoba z borosilikátového skla o obsahu 100 ml se šroubovým uzávěrem s gumovým nebo teflonovým těsněním (např. Duran, Schott) pro použití v sušárně
- 4.3 sušárna s nuceným větráním a tepelnou regulací s přesností lepší než ± 2 °C
- 4.4 pH metr (tři desetinná místa)
- 4.5 membránový filtr (0,2 μ m)
- 4.6 odstředivka
- 4.7 rotační vakuová odparka
- 4.8 mechanická třepačka nebo magnetická míchačka
- 4.9 analyzátor aminokyselin nebo zařízení HPLC s iontoměničovou kolonou, zařízením pro ninhydrin, post kolonovou derivatizací a fotometrickým detektorem.

Kolona se naplní sulfonovanou polystyrenovou pryskyřicí, která umožňuje vzájemné oddělení aminokyselin a separaci od jiných ninhydrin pozitivních látek. Průtok tlumivého roztoku a ninhydrinu zajišťují čerpadla se stálostí průtoku $\pm 0,5$ % po dobu zahrnující standardní kalibraci i analýzu vzorku.

Některé analyzátory aminokyselin je možno použít v případě, že hydrolyzát vykazuje koncentraci sodíkových iontů $c = 0,8$ mol/l a obsahuje zbytkovou mravenčí kyselinu z oxidačního kroku. Jiné analyzátory nezaručují uspokojivou separaci určitých aminokyselin, obsahuje-li hydrolyzát nadbytečnou mravenčí kyselinu a/nebo vysoké koncentrace sodíkových iontů. V takovém případě se sníží objem kyseliny před úpravou pH odpařením hydrolyzátu na objem 5 ml. Odpaření se má provádět ve vakuu při teplotě nejvýše 40 °C.

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se upraví mletím tak, aby prošel sítím s oky 0,5 mm. Vzorky s vysokou vlhkostí se musí před mletím vysušit na vzduchu při teplotě nepřesahující 50 °C nebo při zmrazení. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím extrahují petroletherem (3.12).

5.2 Stanovení volných aminokyselin v krmivech a v premixech

Do kónické baňky se odváží příslušné množství (1–5 g) upraveného vzorku (5.1) s přesností na 0,2 mg a přidá se 100,0 ml extrakční směsi (3.21). Potom se třepé 60 minut na mechanické třepačce nebo míchá na magnetické míchačce (4.8). Po usazení sedimentu se odpipetuje 10,0 ml supernatantu do kádinky o obsahu 100 ml.

Za stálého míchání se přidá 50 ml roztoku kyseliny sulfosalicylové a pokračuje se v míchání na magnetické míchače dalších 5 minut. Supernatant se přefiltruje nebo odstředí tak, aby se odstranila veškerá sraženina. 10,0 ml odstředěného roztoku se přeneso do kádinky o obsahu 100 ml, pH se upraví na 2,20 pomocí roztoku hydroxidu sodného (3.18), potom se roztok převede pomocí citrnanového tlumivého roztoku (3.24) do odměrné baňky přiměřené velikosti a doplní po značku tlumivým roztokem (3.24).

Použije-li se interní standard, přidá se 1,00 ml interního standardu (3.27.3) na každých 100 ml odstředěného roztoku a potom se doplní po značku tlumivým roztokem (3.24).

Dále se pokračuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Nejsou-li extrakty zpracovány též den, uschovávají se při teplotě pod 5 °C.

5.3 Stanovení celkových aminokyselin

5.3.1 oxidace

0,1 až 1 g upraveného vzorku (5.1) se odváží s přesností 0,2 mg:

- do baňky s kulatým dnem o obsahu 100 ml (4.1) pro otevřenou hydrolyzu (5.3.2.3) nebo
- do baňky s kulatým dnem o obsahu 250 ml (4.1), požaduje-li se nízká koncentrace sodíku nebo
- do nádoby o obsahu 100 ml se šroubovacím uzávěrem (4.2) (pro uzavřenou hydrolyzu 5.3.2.4).

Odvážená část vzorku by měla mít obsah dusíku asi 10 mg a obsah vlhkosti nepřesahující 100 mg.

Baňka/nádoba se umístí do lázně s ledovou vodou a ochladí se na 0 °C, potom se přidá 5 ml oxidační směsi (3.23) a promíchá se skleněnou lžící se zahnutou špičkou. Baňka/nádoba se uzavře i se lžící vzduchotěsnou folií a vloží se i s lázní s ledovou vodou do chladničky při 0 °C a ponechá se tam 16 hodin. Po 16 hodinách se vyjme z chladničky a přebytečné oxidační činidlo se rozloží přidáním 0,84 g dvojsíranu sodného (3.4).

Dále se pokračuje podle 5.3.2.1.

5.3.2 hydrolyza

5.3.2.1 hydrolyza oxidovaných vzorků

K oxidovanému vzorku připravenému podle 5.3.1 se přidá 25 ml hydrolyzační směsi (3.20) tak, aby neulpěl žádný vzorek na stěnách nádoby ani na lžici. Podle zvoleného postupu hydrolyzy se pokračuje podle 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4.

5.3.2.2 hydrolyza neoxidovaných vzorků

Do baňky s kulatým dnem o obsahu 100 ml nebo 250 ml (4.1) nebo do nádoby o obsahu 100 ml se šroubovacím uzávěrem (4.2) se odváží 0,1 až 1 g upraveného vzorku (5.1) s přesností na 0,2 mg. Odvážená část vzorku by měla mít obsah dusíku asi 10 mg. Opatrně se přidá 25 ml hydrolyzační směsi (3.20) a smíchá se se vzorkem. Dále se postupuje buď podle 5.3.2.3 nebo podle 5.3.2.4.

5.3.2.3 otevřená hydrolyza

Ke směsi v baňce (připravené podle 5.3.2.1 nebo 5.3.2.2) se přidají 3 skleněné kuličky a směs se uvede do mírného varu pod zpětným chladičem na dobu 23 hodin. Po skončení hydrolyzy se zpětný chladič promyje 5 ml citrnanového tlumivého roztoku (3.24). Baňka se odpojí a ochladí se v ledové lázni. Dále se postupuje podle 5.3.3.

5.3.2.4 uzavřená hydrolyza

Baňka se směsí připravenou podle 5.3.2.1 nebo 5.3.2.2 se umístí do sušárny (4.3) při 110 °C. Aby se během první hodiny zabránilo narůstání tlaku (v důsledku vyvíjení plyných látek) a nedošlo k výbuchu, položí se šroubovací uzávěr volně na baňku. Nádoba se neuzavírá. Po uplynutí jedné hodiny se uzávěr zašroubuje a uzavřená baňka se ponechá v sušárně (4.3) 23 hodin. Po skončení hydrolyzy se baňka vyjme ze sušárny, opatrně se odšroubuje uzávěr a postaví se do lázně s ledovou vodou. Baňka se nechá vychladnout.

Podle zvoleného postupu při úpravě pH (5.3.3) se obsah baňky kvantitativně převede pomocí citrnanového tlumivého roztoku (3.24) do kádinky o obsahu 250 ml nebo do baňky s kulatým dnem o obsahu 250 ml.

Dále se postupuje podle 5.3.3

5.3.3 úprava pH

Podle toho, jakou toleranci k sodíku má analyzátor aminokyselin (4.9), postupujte při úpravě pH podle 5.3.3.1 nebo 5.3.3.2.

5.3.3.1 pro chromatografické systémy (4.9), vyžadující nízkou koncentraci sodíku:

Pokud analyzátor aminokyselin vyžaduje nízkou koncentraci sodíku (má-li se snížit obsah kyselin), doporučuje se použít vnitřní zásobní standardní roztok (3.27.3).

V takovém případě se před odpařováním přidají do hydrolyzátu 2,00 ml vnitřního zásobního standardního základního roztoku (3.27.3).

Do hydrolyzátu pořízeného podle 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4. se přidají 2 kapky 1-oktanolu (3.15).

Na rotační odparce (4.7) se sníží objem na 5-10 ml za vakua při 40 ° C. Pokud by se objem náhodou snížil pod 5 ml, hydrolyzát je třeba odstranit a začít analýzu znovu.

pH se upraví na 2,20 roztokem hydroxidu sodného (3.18) a pokračuje se podle bodu 5.3.4.

5.3.3.2 pro všechny ostatní analyzátory aminokyselin (4.9)

Hydrolyzáty připravené podle 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4 se částečně zneutralizují opatrným přidáním 17 ml roztoku hydroxidu sodného (3.17), za stálého míchání a při zajištěné teplotě pod 40 °C.

pH se upraví na 2,20 roztokem hydroxidu sodného (3.18) při pokojové teplotě. Dále se pokračuje podle bodu 5.3.4.

5.3.4 roztok vzorků pro chromatografii

Hydrolyzát (5.3.3.1 nebo 5.3.3.2) s upraveným pH se kvantitativně převede pomocí citronanového tlumivého roztoku (3.24) do odměrné baňky o obsahu 200 ml a tlumivým roztokem (3.24) se doplní po značku.

Nebyl-li dosud použit vnitřní standard, přidají se 2,00 ml vnitřního standardu (3.27.3) a potom se doplní po značku citronanovým tlumivým roztokem (3.24). Důkladně se promíchá.

Dále se přejde k chromatografii (5.4)

Nejsou-li roztoky vzorků analyzovány též den, uschovávají se při teplotě pod 5 °C.

5.4 Chromatografie

Před chromatografií musí mít extrakt (5.2) a hydrolyzát (5.3.4) pokojovou teplotu. Směs se protřepe a potřebné množství se zfiltruje membránovým filtrem 0,2 µ (4.5). Výsledný čirý roztok se podrobí ionexové chromatografii na analyzátoru aminokyselin (4.9).

Nástřik lze provést ručně nebo automaticky. Přitom je důležité, aby se na sloupec nastříkvalo stejné množství roztoku ± 0,5 % jak při analýze standardů tak vzorků s výjimkou, kdy je použito vnitřního standardu. Rovněž poměr sodíku k aminokyselinám by měl být v standardních roztocích a v roztocích vzorků co možná nejpodobnější.

Frekvence kalibrace závisí hlavně na stabilitě ninhydrinového činidla a analytického systému. Standard nebo vzorek se ředí citronanovým tlumivým roztokem (3.24) tak, aby plocha píku standardu tvořila 30 – 200 % plochy píku pro jednotlivé aminokyseliny v roztoku vzorků.

Chromatografie aminokyselin se mírně liší v závislosti na typu použitého analyzátoru a použitého ionexu. Zvolený systém musí být schopen separovat jednotlivé aminokyseliny od sebe vzájemně i od ostatních ninhydrin pozitivních materiálů. V rozsahu svého působení by měl chromatografický systém lineárně reagovat na změny objemů aminokyselin dávkovaných na sloupec.

Při analýze equimolárního roztok zkoušených aminokyselin, by měly být dosaženy dále uvedené poměry sedla k vrcholu píku. Tyto equimolární roztoky musí obsahovat nejméně 30 % maximálního obsahu jednotlivých aminokyselin, které mohou být ještě přesně stanoveny na použitém analyzátoru aminokyselin (4.9).

Při separaci threoninu a serinu by poměr výšky sedla a vrcholu píku nižšího z obou překrývajících se aminokyselin na chromatogramu neměl přesahovat 2:10 (pokud se stanoví pouze cyst(e)in, methionin, threonin a lysin, je stanovení nepříznivě ovlivněno nedostatečnou separací přilehlých píků). Pro všechny ostatní aminokyseliny musí být separace lepší než 1:10.

Systém musí zaručit, že lysin bude separován od „lysinových náhražek“ a ornithinu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Plocha píků vzorků a standardu se měří pro každou jednotlivou aminokyselinu a vypočítává se množství aminokyseliny v g na kg vzorku.

$$\text{g aminokyseliny na kg vzorku} = \frac{A \times E \times MV \times F}{B \times V \times 1\,000}$$

Je-li použit interní standard, násobí se výsledek: $\frac{D}{C}$

A = plocha píku hydrolyzátu nebo extraktu

B = plocha píku kalibračního standardního roztoku

C = plocha píku interního standardu v hydrolyzátu nebo v extraktu

D = plocha píku interního standardu v kalibračním standardním roztoku

MV = molekulární váha stanovovaných aminokyselin

E = koncentrace standardu v $\mu\text{mol/ml}$

V = hmotnost navážky vzorku (g) (korigovaná na původní váhu pokud je vzorek vysušen nebo odtučněn)

F = celkový objem zkušebního roztoku (5.3.4) v ml nebo celkový objem zředěného extraktu vypočteného podle 6.1

Cystin a cystein se v hydrolyzátech oxidovaného vzorku stanoví jako kyselina cysteová, ale vypočítávají se jako cystin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MV 240,30) s použitím MV 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Methionin se v hydrolyzátech oxidovaného vzorku stanoví jako methioninsulfon, ale vypočítává se jako methionin s použitím MV methioninu: 149,21.

Přidaný volný methionin se zjišťuje po extrakci jako methionin, pro výpočet se použije stejná MV.

- 6.1 Celkový objem zředěného extraktu (F) při stanovení volných aminokyselin (5.2) se vypočítá podle tohoto vzorce:

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

V = objem výsledného extraktu

7. Vyhodnocení metody

Tato metoda byla vyzkoušena porovnáním na mezinárodní úrovni v roce 1990 při použití čtyř různých krmiv (krmná směs pro prasata, krmná směs pro broilery, proteinový koncentrát, premix). Po vyloučení extrémů jsou výsledky středních hodnot a standardních odchylek uvedeny v následující tabulce:

střední hodnoty v g/kg

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	cyst(e)in	Methionin	lysin
Krmná směs pro prasata	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Krmná směs pro broilery	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinový koncentrát	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premix	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

7.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjádřená jako vnitrolaboratorní standardní odchylka je dána následující tabulkou:

standardní odchylka (S_r) opakovatelnosti v laboratoři v g/kg

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	cyst(e)in	Methionin	lysin
Krmná směs pro prasata	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Krmná směs pro brojlerů	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinový koncentrát	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premix	1,30 n = 16	–	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

Variační koeficient (%) vnitřní laboratorních standardních odchylek (S_r)

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	cyst(e)in	Methionin	lysin
Krmná směs pro prasata	1,9 a = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Krmná směs pro brojlerů	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinový koncentrát	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premix	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

7.2 Reprodukovatelnost

Výsledky mezilaboratorních standardních odchylek vyplývající ze shora uvedených zkoušek jsou obsaženy v následující tabulce:

Mezilaboratorní standardní odchylka (S_R) v g/kg

Referenční materiál	Aminokyselina			
	threonin	Cyst(e)in	methionin	lysin
Krmná směs pro prasata	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Krmná směs pro brojlerů	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinový koncentrát	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premix	2,49 n = 16	–	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

Variační koeficient (%) mezilaboratorních standardních odchylek (S_R)

Referenční materiál	aminokyselina			
	threonin	Cyst(e)in	methionin	lysin
Krmná směs pro prasata	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Krmná směs pro brojlerů	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinový koncentrát	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premix	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

8. Použití referenčních materiálů

Správné použití uvedené metody se ověřuje opakovaným měřením certifikovaných referenčních materiálů, jsou-li k dispozici. Doporučuje se kalibrace certifikovanými kalibračními roztoky aminokyselin.

9. Poznámky

- 9.1 Vzhledem k rozdílům mezi analyzátory aminokyselin by se měly uvedené koncentrace kalibračních roztoků standardů aminokyselin (viz 3.27.4 a 3.27.5) a roztoků vzorků (5.3.4) považovat za doporučené.

Lineární rozsah přístroje se musí zkontrolovat pro všechny aminokyseliny.

Standardní roztok se ředí citrnanovým tlumivým roztokem tak, aby se dosáhlo ploch píků uprostřed tohoto rozsahu.

- 9.2 Pokud se k analýze hydrolyzátů použije zařízení pro vysoce účinnou kapalinovou chromatografii, musí být podmínky zkoušek optimalizovány v souladu s doporučením výrobce.
- 9.3 Při použití této metody u krmiv obsahujících více než 1 % chloridu (koncentráty, minerální krmiva, doplňková krmiva) může dojít k podhodnocení obsahu methioninu a musí se proto použít speciální postup.

ČÁST B

STANOVENÍ TUKŮ

1. Účel a oblast použití

Touto metodou se stanoví obsah tuku v krmivech. Metoda se nevztahuje na analýzu olejnatých semen a plodin, jejichž zkoušení se řídí podle nařízení Rady 136/66/EHS ze dne 22. září 1996.

Podle druhu a složení krmiva se pro analýzu použije jeden ze dvou následujících postupů:

1.1 Postup A – přímo extrahovatelné tuky

Tato metoda je použitelná pro krmiva rostlinného původu, s výjimkou těch, které jsou zahrnuty do okruhu postupu B.

1.2 Postup B – celkový tuk

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Používá se pro všechny materiály, z nichž není možno tuk úplně extrahovat bez předchozí hydrolýzy (např. lepky, kvasnice, bramborové proteiny a výrobky, které byly podrobeny zpracování, jako vytlačování, vločkování a zahřívání).

1.3 Interpretace výsledků

Ve všech případech, kdy se dosáhlo vyššího výsledku postupem B, než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu podle postupu B.

2. Princip

2.1 Postup A

Vzorek se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se oddestiluje a zbytek se vysuší a zváží.

2.2 Postup B

Vzorek se zahřívá s kyselinou chlorovodíkovou. Směs se ochladí a přefiltruje. Promytý a usušený zbytek se pak zpracuje podle postupu A.

3. Činidla

3.1 petrolether s bodem varu mezi 40 a 50 °C. Hodnota bromového čísla musí být menší než 1 a zbytek po odpařování menší než 2 mg/100 ml

3.2 síran sodný, bezvodý

3.3 kyselina chlorovodíková, $c = 3 \text{ mol HCl/l}$

3.4 filtrační prostředky, např. křemelina, Hyflo-supercel.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Extrakční přístroj, se sifonem (Soxhletův přístroj), refluxní rychlost by měla umožnit asi 10 cyklů za hodinu. U typu bez sifonu by měla být refluxní rychlost asi 10 ml za minutu.

4.2 Extrakční patrony, bez látek rozpustných v petroletheru, s porositou v souladu s požadavky podle bodu 4.1.

4.3 Sušárna, buď vakuová nařízená na 75 °C $\pm$ 3 °C, nebo horkovzdušná nařízená na 100 °C $\pm$ 3 °C.

5. Postup

5.1 Postup A (viz bod 8.1)

Do extrakční patrony se naváží 5 g vzorku s přesností na 1 mg (4.2) a přikryje smotkem vaty bez tuku.

Patrona se umístí do extrakčního přístroje (4.1) a extrahuje šest hodin petroletherem (3.1). Petroletherový extrakt se jímá do suché, předem zvážené baňky, která obsahuje úlomky pemzy⁽¹⁾.

Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek v baňce se suší 1,5 hodiny v sušárně (4.3). Nechá se vychladnout v exsíkátoru a zváží. Suší se dalších 30 minut, aby se zjistilo, zda je hmotnost tuku konstantní (ztráta hmotnosti mezi dvěma následujícími váženími musí být menší než 1 mg).

5.2 Postup B

Do kádinky o obsahu 400 ml nebo do kónické baňky o obsahu 300 ml se odváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg (viz bod (8,2)) a přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a úlomky pemzy. Kádinka se přikryje hodinovým sklem nebo se kónická baňka opatří refluxním chladičem. Směs se přivede do mírného varu na malém plameni nebo na topné desce a vaří se po dobu jedné hodiny. Během varu se musí zabránit usazování částic vzorku na stěnách nádoby.

Směs se ochladí a přidá se dostatečné množství filtračního prostředku (3.4), aby při filtraci nedošlo ke ztrátám tuku. Filtruje se přes navlhčený dojitý filtrační papír zbavený tuku. Zbytek se promývá studenou vodou, až se získá neutrální filtrát. Proveďte se kontrola, zda filtrát neobsahuje žádný tuk. Jeho přítomnost ukazuje, že se vzorek musí před hydrolýzou extrahovat petroletherem podle postupu A.

Dvojitý filtrační papír se zbytkem se položí na hodinové sklo a suší se půldruhé hodiny v horkovzdušné sušárně (4.3) při teplotě 100 °C $\pm$ 3 °C.

Dvojitý filtrační papír s vysušeným zbytkem se vloží do extrakční patrony (4.2) a přikryje smotkem vaty bez tuku. Patrona se vloží do extrakčního přístroje (4.1) a dále se pokračuje podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

(¹) Pokud se má tuk následně zkoušet na kvalitu, zamění se úlomky pemzy za skleněné kuličky.

6. Vyjádření výsledku

Hmotnost zbytku se vyjádří jako procento ze vzorku.

7. Opakovatelnost

Rozdíl ve výsledcích dvou souběžných stanovení prováděných na stejném vzorku stejným pracovníkem by neměl přesáhnout:

- 0,2 % v absolutní hodnotě, při obsahu tuku nižším než 5 %,
- 4,0 % relativně k nejvyššímu výsledku při obsahu od 5 do 10 %,
- 0,4 % v absolutní hodnotě, při obsahu nad 10 %.

8. Poznámky

- 8.1 U výrobků s vysokým obsahem olejů a tuků, které se obtížně drtí nebo které neumožňují odebrat redukovany homogenní vzorek, se postupuje následujícím způsobem:

Odváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg a smíchá se s 10 nebo i více gramy bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahuje se petroletherem (3.1) podle bodu 5.1. Výsledný extrakt se doplní na 500 ml petroletherem (3.1) a promíchá se. 50 ml roztoku se odpipetuje do malé suché, předem zvážené baňky, obsahující úlomky pemzy⁽¹⁾.

Rozpouštědlo se oddestiluje, baňka se vysuší a pokračuje se podle posledního odstavce bodu 5.1.

Obsah tuku se vypočítá jako procento ze vzorku pomocí následujícího vzorce:

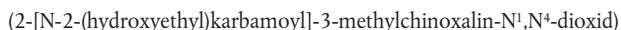
$$(10a + b) \times 5$$

kde:

a = hmotnost zbytku po první extrakci v gramech (poměrná část extraktu)

b = hmotnost zbytku po druhé extrakci v gramech

- 8.2 U výrobků, které mají nízký obsah tuku se může navážka zkušební vzorku zvýšit na 5 g.
- 8.3 Krmiva pro domácí zvířata, která mají vysoký obsah vody, se musí před hydrolyzou a extrakcí podle postupu B smíchat s bezvodým síranem sodným.
- 8.4 V bodě 5.2 se může na opláchnutí zbytků po filtraci účinněji použít horká voda místo vody studené.
- 8.5 U některých krmiv se musí prodloužit doba sušení nad 1,5 hod. Je však třeba zamezit přílišnému vysoušení, které může vést k nízkým výsledkům. Je možno použít i mikrovlnnou troubu.
- 8.6 Při obsahu tuku nad 15 % se doporučuje provést před hydrolyzou extrakci podle postupu A a následně extrakci podle postupu B. Záleží to do jisté míry na druhu krmiva a druhu tuku v krmivu.

ČÁST C**STANOVENÍ OLACHINDOXU****1. Účel a oblast použití**

Touto metodou se stanoví obsah olachindoxu v krmivech. Dolní mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

2. Princip

Vzorek se extrahuje směsí vody a methanolu. Obsah olachindoxu se zjišťuje vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi za použití UV detektoru.

⁽¹⁾ Pokud se má tuk následně zkoušet na kvalitu, zamění se úlomky pemzy za skleněné kuličky.

3. Činidla

3.1 methanol

3.2 methanol, pro HPCL

3.3 voda, pro HPLC

3.4 mobilní fáze pro HPLC:

Směs vody (3.3) a methanolu (3.2), 900 + 100 (V + V)

3.5 standardní látka: čistý olachindox 2-[N-2-(hydroxyethyl)karbomoyl]-3-methylchinoxalin-N¹,N⁴-dioxid, E 851

3.5.1 zásobní standardní základní roztok olachindoxu, 250 µg/ml

Do odměrné baňky o obsahu 200 ml se odváží 50 mg olachindoxu (3.5) s přesností na 0,1 mg a přidá cca 190 ml vody. Baňka se postaví na 20 minut do ultrazvukové lázně (4.1). Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a zamíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschovává v chladničce. Tento roztok se musí připravovat čerstvý každý měsíc.

3.5.2 pracovní standardní roztok olachindoxu, 25 µg/ml

10,0 ml zásobního standardního základního roztoku (3.5.1) se přenese do odměrné baňky o obsahu 100 ml, doplní se po značku mobilní fází (3.4) a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschovává v chladničce. Tento roztok se musí připravovat denně čerstvý.

3.5.3 kalibrační roztoky

Do řady odměrných baněk o obsahu 50 ml se odpipetuje 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 a 20,0 ml pracovního standardního roztoku (3.5.2). Doplní se mobilní fází (3.4) po značku a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií. Tyto roztoky odpovídají 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 a 10,0 µg olachindoxu na ml.

Tyto roztoky se musí připravovat denně čerstvé.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 ultrazvuková lázeň

4.2 mechanická třepačka

4.3 zařízení HPLC s proměnnou vlnovou délkou ultrafialového detektoru nebo s detektorem diodového pole

4.3.1 kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm x 4 mm, plnidlo C18, 10 µm, nebo srovnatelná kolona

4.4 membránové filtry s póry 0,45 µm

5. Postup

Poznámka: Olachindox je citlivý na světlo. Všechny postupy se musí provádět při tlumeném světle nebo v nádobách z tmavého skla.

5.1 *Obecně*

5.1.1 Modelové krmivo se musí předem analyzovat pro kontrolu, zda neobsahuje olachindox nebo jiné interferující látky.

5.1.2 Zkouška na výtěžnost se provede analýzou modelového krmiva obohaceného přidáním takového množství olachindoxu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku K fortifikaci na úroveň 50 mg/kg se odpipetuje 10,0 ml zásobního standardního základního roztoku (3.5.1) do kónické baňky o obsahu 250 ml a roztok se odpaří na cca 0,5 ml. Přidá se 50 g modelového krmiva, řádně se promíchá a nechá se 10 minut odstát, přičemž se ještě několikrát promíchá. Dále se přejde k extrakci (5.2).

Poznámka: Pro účely této metody má být modelové krmivo podobného typu jako zkoušený vzorek a nesmí obsahovat olachindox.

5.2 *Extrakce*

Navází se přibližně 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přenese se do kónické baňky o obsahu 1 000 ml, přidá se 100 ml methanolu (3.1) a baňka se umístí na pět minut do ultrazvukové lázně (4.1). Přidá se 410 ml vody a ponechá se v ultrazvukové lázni dalších 15 minut. Baňka se vyjme z ultrazvukové lázně, dále se třepe 30 minut ve třepačce (4.2) a potom se přefiltruje složeným filtrem. 10,0 ml filtrátu se přenese do odměrné baňky o obsahu 20 ml, doplní se vodou po značku a promíchá. Poměrná část se přefiltruje membránovým filtrem (4.4) (viz bod 9. Poznámky). Dále se pokračuje stanovením HPLC (5.3).

5.3 Stanovení HPLC

5.3.1 Parametry:

Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že dávají rovnocenné výsledky.

analytická kolona (4.3.1)

mobilní fáze (3.4): Směs vody (3.3) a methanolu (3.2), 900 + 100 (V + V)

průtoková rychlost: 1,5–2 ml/min

detekční vlnová délka: 380 nm

objem nástřiku: 20 µl–100 µl

Stabilita chromatografického systému se zkontroluje tím, že se několikrát nastříkne kalibrační roztok (3.5.3) obsahující 2,5 µg/ml, až se dosáhne konstantních výšek píků a retenčních časů.

5.3.2 Kalibrační graf

Pro každý kalibrační roztok se provede několik nástřiků a zjistí se střední hodnota výšky (plochy) píku pro každou koncentraci. Sestrojí se graf za použití středních hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků jako ordinát a příslušných koncentrací v µg/ml jako souřadnic.

5.3.3 Roztok vzorku

Provede se několik nástřiků extraktu vzorku (5.2) při použití stejného objemu jako u kalibračních roztoků a zjistí se střední výška (plocha) píků olachindoxu.

6. Výpočet výsledků

Ze střední hodnoty výšky (plochy) píků olachindoxu v roztoku vzorku se zjistí koncentrace v roztoku vzorku v µg/ml porovnáním s kalibračním grafem (5.3.2).

Obsah olachindoxu ve vzorku w v mg/kg je dán následující rovnicí:

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

kde:

c = koncentrace olachindoxu v extraktu vzorku (5.2) v µg/ml

m = hmotnost navážky vzorku v g (5.2)

7. Vyhodnocení výsledků

7.1 Identita

Identita analytu může být potvrzena opakovaným stanovením s přidavkem (co-chromatography) anebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku (5.2) a kalibračního roztoku (3.5.3), obsahujícího 5,0 µg/ml olachindoxu.

7.1.1 Opakované stanovením s přidavkem (co-chromatography)

Extrakt vzorku (5.2) se obohatí přidavkem přiměřeného množství kalibračního roztoku (3.5.3). Množství přidaného olachindoxu by mělo odpovídat množství olachindoxu nalezeného v extraktu vzorku.

S ohledem na přidané množství a zředění extraktu by mělo dojít jen ke zvýšení výšky píku olachindoxu. Šířka píku v polovině jeho výšky musí být v rozmezí $\pm 10\%$ původní šířky píku olachindoxu v neobohaceném extraktu vzorku.

7.1.2 Detektor diodového pole

Výsledky se vyhodnocují podle následujících kritérií:

- při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s nepřesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává ± 2 nm;

- b) při vlnové délce mezi 220 a 400 nm se nesmí záznam spektra zkoušeného vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže nikde odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorpance standardního analytu;
- b) při vlnové délce mezi 220 a 350 nm se nesmí spektrum vzestupu, vrcholu a sestupu píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorpance spektra ve vrcholu píku.

Není-li některé z těchto kritérií splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou souběžných stanovení, prováděných na stejném vzorku při obsahu olachindoxu mezi 10 a 20 mg/kg, nesmí přesáhnout 15 % vyššího výsledku.

7.3 Výtěžnost

Pro obohacený modelový vzorek musí být výtěžnost nejméně 90 %.

8. Výsledky kruhového testu

V rámci ES byl proveden kruhový test, při němž až 13 laboratoří analyzovalo čtyři vzorky krmiva pro selata, včetně jednoho modelového vzorku. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	
L	13	10	11	11
A	40	40	44	44
střední (mg/kg)	-	14,6	48,0	95,4
(Sr) (mg/kg)	-	0,82	2,05	6,36
(SR) (mg/kg)	-	1,62	4,28	8,42
CV _r (%)	-	5,6	4,3	6,7
CV _R (%)	-	11,1	8,9	8,8
nominální obsah (mg/kg)	-	15	50	100
výtěžnost (%)	-	97,3	96,0	95,4

L : počet laboratoří

n : počet jednotlivých hodnot

S_r : standardní odchylka opakovatelnosti

S_R : standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_r : variační koeficient opakovatelnosti

CV_R : variační koeficient reprodukovatelnosti

9. Poznámky

Ačkoliv tato metoda nebyla ověřena pro krmivo obsahující více než 100 mg/kg olachindoxu, je možné obdržet uspokojivé výsledky menší navážkou vzorku a/nebo zředěním extraktu (5.2) tak, aby se dosáhlo koncentrace v rozsahu kalibračního grafu (5.3.2).