

Ovaj je dokument samo dokumentacijska pomoć za čiji sadržaj institucije ne preuzimaju odgovornost.

► **B**

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 152/2009

od 27. siječnja 2009.

o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje

(Tekst značajan za EGP)

(SL L 54, 26.2.2009., str. 1)

Promijenio:

Službeni list

		br.	stranica	datum
► <u>M1</u>	Uredba Komisije (EU) br. 278/2012 od 28. ožujka 2012.	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Uredba Komisije (EU) br. 51/2013 od 16. siječnja 2013.	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Uredba Komisije (EU) br. 691/2013 od 19. srpnja 2013.	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Uredba Komisije (EU) br. 709/2014 od 20. lipnja 2014.	L 188	1	27.6.2014



UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 152/2009

od 27. siječnja 2009.

o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje

(Tekst značajan za EGP)

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Uredbu (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o službenom nadzoru koji se provodi radi provjere pridržavanja propisa o hrani i hrani za životinje te pravila o zdravlju i dobrobiti životinja ⁽¹⁾, a posebno njezin članak 11. stavak 4. točke (a), (b) i (c),

budući da:

(1) Sljedeći akti doneseni su za provedbu Direktive 70/373/EEZ i ostaju na snazi u skladu s člankom 61. stavkom 2. Uredbe (EZ) br. 882/2004:

- Prva direktiva Komisije 71/250/EEZ od 15. lipnja 1971. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽²⁾,
- Druga direktiva Komisije 71/393/EEZ od 18. studenoga 1971. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽³⁾,
- Treća direktiva Komisije 72/199/EEZ od 27. travnja 1972. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁴⁾,
- Četvrta direktiva Komisije 73/46/EEZ od 5. prosinca 1972. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁵⁾,
- Prva direktiva Komisije 76/371/EEZ od 1. ožujka 1976. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁶⁾,
- Sedma direktiva Komisije 76/372/EEZ od 1. ožujka 1976. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁷⁾,

⁽¹⁾ SL L 165, 30.4.2004., str. 1., ispravljeno u SL L 191, 28.5.2004., str. 1.

⁽²⁾ SL L 155, 12.7.1971., str. 13.

⁽³⁾ SL L 279, 20.12.1971., str. 7.

⁽⁴⁾ SL L 123, 29.5.1972., str. 6.

⁽⁵⁾ SL L 83, 30.3.1973., str. 21.

⁽⁶⁾ SL L 102, 15.4.1976., str. 1.

⁽⁷⁾ SL L 102, 15.4.1976., str. 8.

▼B

- Osmo direktiva Komisije 78/633/EEZ od 15. lipnja 1978. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽¹⁾,
- Deveta direktiva Komisije 81/715/EEZ od 31. srpnja 1981. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽²⁾,
- Deseta direktiva Komisije 84/425/EEZ od 25. srpnja 1984. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽³⁾,
- Direktiva Komisije 86/174/EEZ od 9. travnja 1986. o utvrđivanju metode izračuna energetske vrijednosti krmnih smjesa za perad ⁽⁴⁾,
- Jedanaesta direktiva Komisije 93/70/EEZ od 28. srpnja 1993. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁵⁾,
- Dvanaesta direktiva Komisije 93/117/EZ od 17. prosinca 1993. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za službenu kontrolu hrane za životinje ⁽⁶⁾,
- Direktiva Komisije 98/64/EZ od 3. rujna 1998. o utvrđivanju analitičkih metoda Zajednice za utvrđivanje aminokiselina, sirovih ulja i masti te olakvindoksa u hrani za životinje i o izmjeni Direktive 71/393/EEZ ⁽⁷⁾,
- Direktiva Komisije 1999/27/EZ od 20. travnja 1999. o utvrđivanju metoda analize Zajednice za određivanje amproliuma, diklazurila i karbadoksa u hrani za životinje te kojom se izmjenjuju direktive 71/250/EEZ i 73/46/EEZ i stavlja izvan snage Direktiva 74/203/EEZ ⁽⁸⁾,
- Direktiva Komisije 1999/76/EZ od 23. srpnja 1999. o utvrđivanju metode analize Zajednice za određivanje lasalocid natrija u hrani za životinje ⁽⁹⁾,
- Direktiva Komisije 2000/45/EZ od 6. srpnja 2000. o utvrđivanju metode analize Zajednice za određivanje vitamina A, vitamina E i triptofana u hrani za životinje ⁽¹⁰⁾,
- Direktiva Komisije 2002/70/EZ od 26. srpnja 2002. o utvrđivanju uvjeta za određivanje razina dioksina i PCB-a sličnih dioksinu u hrani za životinje ⁽¹¹⁾,

⁽¹⁾ SL L 206, 29.7.1978., str. 43.

⁽²⁾ SL L 257, 10.9.1981., str. 38.

⁽³⁾ SL L 238, 6.9.1984., str. 34.

⁽⁴⁾ SL L 130, 16.5.1986., str. 53.

⁽⁵⁾ SL L 234, 17.9.1993., str. 17.

⁽⁶⁾ SL L 329, 30.12.1993., str. 54.

⁽⁷⁾ SL L 257, 19.9.1998., str. 14.

⁽⁸⁾ SL L 118, 6.5.1999., str. 36.

⁽⁹⁾ SL L 207, 6.8.1999., str. 13.

⁽¹⁰⁾ SL L 174, 13.7.2000., str. 32.

⁽¹¹⁾ SL L 209, 6.8.2002., str. 15.

▼B

- Direktiva Komisije 2003/126/EZ od 23. prosinca 2003. o utvrđivanju metode analize za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u okviru službene kontrole hrane za životinje ⁽¹⁾.
- (2) S obzirom da je Direktiva 70/373/EEZ zamijenjena Uredbom (EZ) br. 882/2004, prikladno je zamijeniti provedbene akte navedene Direktive jednom uredbom. Istodobno je potrebno prilagoditi metode s obzirom na znanstveno-tehnološki razvoj. Potrebno je staviti izvan snage metode koje više nisu valjane za njihovu predviđenu namjenu. Iako je predviđeno pravodobno ažuriranje odredaba o uzorkovanju kako bi se uzeli u obzir najnoviji rezultati razvoja u proizvodnji, skladištenju, prijevozu i trgovanju hranom za životinje, za sada je primjereno zadržati postojeće odredbe o uzorkovanju.
- (3) Zbog toga treba staviti izvan snage direktive 71/250/EEZ, 71/393/EEZ, 72/199/EEZ, 73/46/EEZ, 76/371/EEZ, 76/372/EEZ, 78/633/EEZ, 81/715/EEZ, 84/425/EEZ, 86/174/EEZ, 93/70/EEZ, 93/117/EZ, 98/64/EZ, 1999/27/EZ, 1999/76/EZ, 2000/45/EZ, 2002/70/EZ i 2003/126/EZ.
- (4) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Stalnog odbora za prehrambeni lanac i zdravlje životinja,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

▼M3*Članak 1.*

Uzorkovanje za službenu kontrolu hrane za životinje, posebno u vezi s određivanjem sastojaka, uključujući materijal koji sadržava genetski modificirane organizme (GMO) ili se od njih sastoji ili proizvodi, dodataka u hrani za životinje kako su utvrđeni Uredbom (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽²⁾, nepoželjnih tvari kako su definirane Direktivom 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća ⁽³⁾, provodi se u skladu s metodama iz Priloga I.)

Metoda uzorkovanja iz Priloga I. primjenjuje se za kontrolu hrane za životinje u vezi s određivanjem ostataka pesticida kako su utvrđeni Uredbom (EZ) br. 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽⁴⁾. i kontrolu sukladnosti s Uredbom (EU) br. 619/2011.

▼B*Članak 2.*

Priprema uzoraka za analizu i prikazivanje rezultata izvode se u skladu s metodama iz Priloga II.

⁽¹⁾ SL L 339, 24.12.2003., str. 78.

⁽²⁾ SL L 268, 18.10.2003., str. 29.

⁽³⁾ SL L 140, 30.05.2002., str. 10.

⁽⁴⁾ SL L 70, 16.3.2005., str. 1.

▼B*Članak 3.*

Analiza za službenu kontrolu hrane za životinje izvodi se pomoću metoda iz Priloga III. (Analitičke metode za kontrolu sastava hrane za životinje i krmnih smjesa), Priloga IV. (Analitičke metode za kontrolu količine dopuštenih krmnih dodataka), Priloga V. (Analitičke metode za kontrolu nepoželjnih tvari u hrani za životinje) i Priloga VI. (Analitičke metode za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u okviru službene kontrole hrane za životinje).

Članak 4.

Energetska vrijednost krmnih smjesa za perad izračunava se u skladu s Prilogom VII.

Članak 5.

U svrhu potvrđivanja koriste se metode analize za kontrolu nedopuštenih krmnih dodataka iz Priloga VIII.

Članak 6.

Direktive 71/250/EEZ, 71/393/EEZ, 72/199/EEZ, 73/46/EEZ, 76/371/EEZ, 76/372/EEZ, 78/633/EEZ, 81/715/EEZ, 84/425/EEZ, 86/174/EEZ, 93/70/EEZ, 93/117/EEZ, 98/64/EZ, 1999/27/EZ, 1999/76/EZ, 2000/45/EZ, 2002/70/EZ i 2003/126/EZ stavljaju se izvan snage.

Upućivanja na Direktive stavljene izvan snage smatraju se upućivanjima na ovu Uredbu i tumače u skladu s korelacijskim tablicama iz Priloga IX.

Članak 7.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ona se primjenjuje od 26. kolovoza 2009.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

▼ **M3***PRILOG I.***METODE UZORKOVANJA****1. SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE**

Uzorci za službenu kontrolu hrane za životinje uzimaju se u skladu s metodama opisanima u nastavku. Tako dobiveni uzorci smatraju se reprezentativnima za uzorkovane dijelove.

Svrha reprezentativnog uzorkovanja dobivanje je manje količine iz serije na način da određivanje bilo koje posebne osobine te količine predstavlja srednju vrijednost osobine serije. Serija se uzorkuje ponovljenim uzimanjem pojedinačnih uzoraka pri različitim jedinstvenim položajima u seriji. Ti pojedinačni uzorci kombiniraju se miješanjem kako bi se stvorio skupni uzorak iz kojeg se reprezentativnim dijeljenjem pripremaju reprezentativni konačni uzorci.

Ako se vizualnom inspekcijom utvrdi razlika u kvaliteti dijelova hrane za životinje namijenjene uzorkovanju u odnosu na preostali dio iste serije, takvi dijelovi razdvajaju se od ostatka hrane za životinje te se s njima postupa kao s odvojenom podserijom. Ako nije moguće razdijeliti hranu za životinje u odvojene podserije, hrana za životinje uzorkuje se kao jedna serija. Tada se to navodi u izvješću o uzorkovanju.

Ako se utvrdi da hrana za životinje, uzorkovana u skladu s odredbama ove Uredbe ne ispunjava uvjete EU-a i dio je jedne serije istovrsnog razreda ili opisa, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve sigurnosti EU-a.

2. DEFINICIJE POJMOVA

— Serija: identificirana količina hrane za životinje za koju je utvrđeno da posjeduje zajedničke osobine kao što je podrijetlo, sorta, način pakiranja, poduzeće koje pakira proizvode, pošiljatelj ili označivanje, a u slučaju proizvodnog postupka, proizvodna jedinica iz jedinstvenog postrojenja koja se koristi jedinstvenim proizvodnim parametrima ili nekoliko takvih jedinica pri neprekinutoj proizvodnji i skupnom skladištenju.

— Uzorkovani dio: serija ili identificirani dio serije ili podserije.

— Zapečaćeni uzorak: uzorak zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata.

— Pojedinačni uzorak: količina koja se uzima iz jedne točke uzorka.

— Skupni uzorak: skup pojedinačnih uzoraka uzetih iz istog uzorkovanog dijela.

— Reducirani uzorak: dio skupnog uzorka dobiven postupkom reprezentativnog smanjivanja skupnog uzorka.

— Konačni uzorak: dio reduciranog uzorka ili homogeniziranog skupnog uzorka.

— Laboratorijski uzorak: uzorak namijenjen za laboratorij (zaprmljen u laboratorij) koji može biti konačan, smanjeni ili skupni uzorak.

▼ **M3**

3. OPĆE ODREDBE

- Osoblje koje uzima uzorke: uzorke uzimaju osobe koje u tu svrhu ovlašćuju nadležna tijela.
- Uzorak mora biti zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata. Oznaka pečata treba biti jasno prepoznatljiva i vidljiva. Uzorak se može pohraniti u posudu koja se zatvara na način da se ne može otvoriti bez nepovratnog oštećivanja prijemnog spremnika ili posude čime se izbjegava ponovno korištenje prijemnog spremnika ili posude.
- Identifikacija uzorka: uzorak mora biti neizbrisivo označen i mora se identificirati na način da postoji nedvojbeni veza s izvješćem o uzorku.
- Iz svakog skupnog uzorka uzimaju se najmanje dva konačna uzorka: najmanje jedan za kontrolu (za potrebe provedbe) i jedan za nositelja djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje (za potrebe prizivnog postupka). Naposljetku, za referencu se može uzeti jedan konačan uzorak. Ako je cjelokupan skupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog skupnog uzorka, osim ako je takav postupak u suprotnosti s pravilima država članica o pravima nositelja djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje.

4. OPREMA

- 4.1 Oprema za uzorkovanje mora biti izrađena od materijala koji ne mogu kontaminirati proizvode namijenjene uzorkovanju. Oprema namijenjena višestrukoj uporabi mora biti jednostavna za čišćenje kako bi se izbjegla križna kontaminacija.

4.2 **Preporučena oprema za uzorkovanje krute hrane za životinje.**4.2.1 *Ručno uzorkovanje*

- 4.2.1.1 Lopatica s ravnim dnom i okomitim stranicama.

- 4.2.1.2 Sonda za uzorkovanje s dugim procjepom ili pregradama. Dimenzije sonde za uzorkovanje moraju odgovarati osobinama uzorka (dubina posude, veličina vreće itd.) i veličini čestica hrane za životinje.

Ako sonda za uzorkovanje ima nekoliko otvora, oni se odvajaju pregradama ili raspoređenim otvorima kako bi se osiguralo da se uzorak uzima na različitim mjestima uzduž sonde.

4.2.2 *Mehaničko uzorkovanje*

Za uzorkovanje hrane za životinje koja se kreće može se koristiti odgovarajuća mehanička oprema. Odgovarajuća mehanička oprema znači da se uzorkuje najmanje čitav dio protoka.

Uzorkovanje hrane za životinje u pokretu (pri velikim brzinama protoka) može se provesti automatskim uzorkivačima.

4.2.3 *Razdjelnik*

Ako je moguće i prikladno, oprema namijenjena za razdvajanje uzorka na približno jednake dijelove treba se koristiti za pripremu reduciranih uzoraka na reprezentativan način.

▼ M3

5. KOLIČINSKI ZAHTJEVI U VEZI S BROJEM POJEDINAČNIH UZORAKA

— Količinski zahtjevi iz točaka 5.1. i 5.2. u vezi s brojem pojedinačnih uzoraka primjenjuju se za uzorkovane dijelove u veličinama do najviše 500 tona koji se mogu uzorkovati na reprezentativan način. Opisani postupak uzorkovanja važeći je i za količine veće od propisane maksimalne veličine uzorkovanog dijela pod uvjetom da se najveći broj pojedinačnih uzoraka iz tablice koja slijedi zanemari, pri čemu se broj pojedinačnih uzoraka određuje formulom kvadratnog korijena navedenom u odgovarajućem dijelu postupka (više o tome u točki 5.3.), a najmanja skupna veličina uzorka proporcionalno se uvećala. Ovime se ne sprječava razdvajanje velike serije u nekoliko manjih podserija te uzorkovanje svake podserije u skladu s postupkom opisanim u točkama 5.1. i 5.2.

— Veličina uzorkovanog dijela mora biti takva da svaki od njegovih sastavnih dijelova može biti uzorkovan.

— Za jako velike serije ili podserije (> 500 tona) i za serije koje se prevoze ili skladište na takav način da je uzorkovanje nemoguće u skladu s postupkom uzorkovanja predviđenim točkama 5.1. i 5.2. ovog poglavlja, primjenjuje se postupak uzorkovanja predviđen točkom 5.3.

— U slučaju da je nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje prema propisima obvezan udovoljiti ovoj Uredbi u okviru obveznog sustava nadzora, nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje može odstupati od količinskih zahtjeva predviđenih ovim poglavljem kako bi se u obzir uzele operativne karakteristike pod uvjetom da je nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje dokazao nadležnim tijelima istovjetnost postupka uzorkovanja u pogledu reprezentativnosti i nakon dobivenog odobrenja od nadležnog tijela.

— Iznimno, ako nije moguće provesti navedenu metodu uzorkovanja u vezi s količinskim zahtjevima zbog neprihvatljive komercijalne štete na seriji (zbog oblika pakiranja, prijevoznih sredstava, načina skladištenja itd.), može se primijeniti alternativni način uzorkovanja pod uvjetom da je što reprezentativniji te u potpunosti opisan i dokumentiran.

5.1 Količinski zahtjevi u vezi s pojedinačnim uzorcima pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje

5.1.1 Kruta hrana za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	Kvadratni korijen iz dvadeseterokratnika broja tona u uzorkovanom dijelu (*), do 40 pojedinačnih uzoraka

(*) Kada dobiveni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.

▼M3

5.1.2 *Tekuća hrana za životinje u rasutom stanju*

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tone ili ≤ 2 500 litara	4 (*)
> 2,5 tone ili > 2 500 litara	7 (*)

(*) Ako nije moguće dobiti homogenu tekućinu, potrebno je uvećati broj pojedinačnih uzoraka.

5.1.3 *Pakirana hrana za životinje*

Hrana za životinje (u krutom ili tekućem stanju) može se pakirati u vreće, limenke, bačve itd. koje su u tablici označene kao jedinice. Velike jedinice (≥ 500 kg ili litara) moraju se uzorkovati u skladu s odredbama predviđenima za hranu za životinje u rasutom stanju (više o tome u točkama 5.1.1. i 5.1.2.).

Veličina uzorkovanog dijela	Minimalan broj jedinica (najmanje jedna) namijenjenih uzimanju pojedinačnog uzorka (*)
1 do 20 jedinica	1 jedinica (**)
21 do 150 jedinica	3 jedinice (**)
151 do 400 jedinica	5 jedinica (**)
> 400 jedinica	Jedna četvrtina kvadratnog korijena iz broja jedinica u uzorkovanom dijelu (***), do 40 jedinica

(*) U slučaju kada otvaranje jedinice može utjecati na analizu (npr. kvarljiva vlažna hrana za životinje), neotvorena jedinica služi kao pojedinačni uzorak.

(**) Za jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kilogram ili jednu litru, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice.

(***) Kada dobiveni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.

5.1.4 *Krmni blokovi ili kameni za lizanje*

Najmanje 1 blok ili kamen za lizanje za uzorkovanje po uzorkovanom dijelu od 25 jedinica, do najviše 4 bloka ili kamena za lizanje.

Za četiri bloka ili kamena za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak sadržaj je jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

5.1.5 *Vlaknasta krma/krmivo*

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka (*)
≤ 5 tona	5
> 5 tona	Kvadratni korijen iz peterokratnika broja tona u uzorkovanom dijelu (**), do 40 pojedinačnih uzoraka

(*) Uzima se u obzir da u određenim situacijama (npr. kod silaža) nije moguće uzeti potrebne pojedinačne uzorke bez uzrokovanja neprihvatljive štete na seriji. U tim situacijama može se primijeniti druga metoda uzorkovanja, a smjernice za uzorkovanje takvih serija objasniti će se prije stupanja na snagu ove Uredbe.

(**) Kada dobiveni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.

▼ **M3****5.2 Količinski zahtjevi u vezi s pojedinačnim uzorcima pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje**

Ti količinski zahtjevi u pogledu pojedinačnih uzoraka koriste se u sljedećim situacijama:

- kontrola aflatoksina, raženih gljivica, ostalih mikotoksina i štetnih botaničkih nečistoća u hrani za životinje;
- kontrola križne kontaminacije sastojkom, uključujući i genetski modificiranim materijalom, ili tvari za koju se očekuje neujednačena distribucija u hrani za životinje.

Ako kontrolno tijelo utemeljeno sumnja u postojanje takve neujednačene distribucije i u slučaju križne kontaminacije sastojkom ili tvari u krmnoj smjesi, primjenjuju se količinski zahtjevi navedeni u tablici u nastavku.

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
< 80 tona	Vidjeti količinske zahtjeve u točki 5.1. Broj pojedinačnih zahtjeva koji se moraju uzeti množi se sa 2,5.
≥ 80 tona	100

5.3 Količinski zahtjevi u vezi s pojedinačnim uzorcima kod vrlo velikih serija

U slučaju velikih uzorkovanih dijelova (uzorkovani dijelovi > 500 tona), broj pojedinačnih uzoraka namijenjenih uzorkovanju = 40 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korijen iz količine tona pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u cijelom uzorku ili 100 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korijen iz količine tona pri kontroli sastojaka ili tvari vjerojatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje.

6. KOLIČINSKI ZAHTJEVI U VEZI SA SKUPNIM UZORKOM

Zahtijeva se samo jedan skupni uzorak na uzorkovani dio.

	Vrsta hrane za životinje	Najmanja veličina skupnog uzorka (*) (**) (***)
6.1.	Hrana za životinje u rasutom stanju	4 kg
6.2.	Pakirana hrana za životinje:	4 kg (***)

▼ M3

Zahtijeva se samo jedan skupni uzorak na uzorkovani dio.

	Vrsta hrane za životinje	Najmanja veličina skupnog uzorka (*) (**)
6.3.	Tekuća ili polutekuća hrana za životinje:	4 litara
6.4.	Krmni blokovi ili kameni za lizanje:	
6.4.1.	pojedinačne mase veće od 1 kg	4 kg
6.4.2.	pojedinačne mase ne veće od 1 kg	masa četiri izvorna bloka ili kamena za lizanje
6.5.	Vlaknasta krma/krmivo	4 kg (****)

(*) Ako se uzorkuje hrana za životinje visoke vrijednosti, može se uzeti manja količina skupnog uzorka pod uvjetom da se to opiše i navede u izvješću o uzorkovanju.

(**) U skladu s odredbama Uredbe Komisije (EU) br. 619/2011 od 24. lipnja 2011. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje s obzirom na prisutnost genetski modificiranog materijala za koji je postupak odobravanja u tijeku ili je odobrenje isteklo (SL L 166, 25.6.2011. str. 9), skupni uzorak za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala mora sadržavati najmanje 35 000 sjemenki/zrna. Prema tome, veličina skupnog uzorka za kukuruz mora biti najmanje 10,5 kg, a za soju 7 kg. Za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, riža, raž, pšenica i sjeme repe, skupna veličina uzorka od 4 kg odgovara količini od 35 000 sjemenki.

(***) U slučaju pakirane hrane za životinje, možda neće biti moguće postići veličinu od 4 kg za skupni uzorak, ovisno o veličini pojedinačnih jedinica.

(****) U slučaju vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine (npr. sijeno, slama), skupni uzorak treba imati najmanje 1 kg.

7. KOLIČINSKI ZAHTEJEVI U VEZI S KONAČNIM UZORCIMA

Konačni uzorci

Potrebna je analiza najmanje jednog konačnog uzorka. Količina konačnog uzorka za analizu ne smije biti manja od:

kruta hrana za životinje	500 g (*) (**) (***)
tekuća ili polutekuća hrana za životinje	500 ml (*)

(*) U skladu s odredbama Uredbe (EU) 619/2011 od, konačni uzorak za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala mora sadržavati najmanje 10 000 sjemenki/zrna. Prema tome, za kukuruz veličina konačnog uzorka mora biti najmanje 3 000 g, a za soju 2 000 g. Za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, riža, raž, pšenica i sjeme repe, skupna veličina uzorka od 500 g odgovara više od 10 000 sjemenki.

(**) Ako je skupni uzorak znatno manji od 4 kg ili litara (vidjeti u bilješkama točku 6.), može se uzeti i manja količina konačnog uzorka pod uvjetom da se to opiše i navede u izvješću o uzorkovanju.

(***) Pri uzorkovanju mahunarki, zrna žitarica i orašastog voća za određivanje ostataka pesticida, najmanja veličina konačnog uzorka iznosi 1 kg u skladu s odredbama Direktive Komisije 2002/63/EZ (SL L 187, 16.7.2002., str. 30).

▼ **M3**

8. METODE UZORKOVANJA ZA VRLO VELIKE SERIJE ILI SERIJE KOJE SE SKLADIŠTE ILI PREVOZE NA NAČIN DA UZORKOVANJE U ČITAVOJ SERIJI NIJE MOGUĆE

8.1 **Opća načela**

Ako način prijevoza ili skladištenja serije onemogućuje uzimanje pojedinačnih uzoraka u čitavoj seriji, uzorkovanje takvih serija treba se provoditi kada je serija u protoku.

Kod velikih skladišta namijenjenih skladištenju hrane za životinje, nositelji djelatnosti treba se poticati da ugrade opremu u skladištu koja omogućuje (automatsko) uzorkovanje u čitavoj skladištenoj seriji.

Kod primjene postupaka uzorkovanja predviđenih u poglavlju 8. nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje ili njihov predstavnik obavještava se o postupku uzorkovanja. Ako nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik dovede u pitanje taj postupak uzorkovanja, nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik omogućuje nadležnom tijelu uzrokovanje u čitavoj seriji na vlastiti trošak.

8.2 **Velike serije koje se prevoze brodom**

8.2.1 *Dinamičko uzorkovanje velikih serija koje se prevoze brodom*

Uzorkovanje velikih serija u brodovima provodi se po mogućnosti dok je proizvod u protoku (dinamičko uzorkovanje).

Uzorkovanje se vrši po brodomskom skladištu (subjekt koji se može fizički odvojiti). Međutim, brodska skladišta djelomično se prazne jedno za drugim tako da početno fizičko odvajanje više ne postoji nakon prijenosa u skladišnim objektima. Uzorkovanje se stoga može provesti u funkciji početnog fizičkog razdvajanja ili u funkciji razdvajanja nakon prijenosa u skladišne objekte.

Istovar broda može trajati nekoliko dana. Obično se uzorkovanje mora provesti u redovnim intervalima tijekom trajanja istovara. Međutim, nije uvijek moguće ili prikladno da službeni inspektor bude prisutan na uzorkovanju tijekom čitavog trajanja istovara. Stoga je dopušteno provesti uzorkovanje za dio (uzorkovani dio) čitave serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara zahtjevima EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

Prisutnost inspektora potrebna je čak i kada je službeni uzorak uzet automatski. Međutim, ako se automatsko uzorkovanje provodi s unaprijed zadanim parametrima koji se ne mogu mijenjati tijekom uzorkovanja, a pojedinačni uzorci se skupljaju u zapečaćeni prijamni spremnik čime se sprječava svaka moguća prijevara, tada je prisutnost inspektora potrebna samo na početku uzorkovanja, pri svakoj promjeni prijamnog spremnika za uzorak i na kraju uzorkovanja.

▼ **M3****8.2.2** *Statičko uzorkovanje serija koje se prevoze brodom*

Ako se uzorkovanje provodi statičkim uzorkovanjem, primjenjuje se istovjetni postupak koji je predviđen za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa s gornje strane (vidjeti točku 8.4.1.).

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/ broskog skladišta. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

8.3 **Uzorkovanje velikih serija koje se skladište u skladištima**

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimajući u obzir veličinu uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara zahtjevima EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

8.4 **Uzorkovanje skladišnih objekata (silosa)****8.4.1** *Uzorkovanje silosa kojima se (jednostavno) pristupa odozgo*

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara zahtjevima EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

8.4.2 *Uzorkovanje silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)***8.4.2.1** *Silos koji se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine > 100 tona*

Hrana za životinje u tim silosima ne može se uzorkovati na statički način. Prema tome, ako se hrana za životinje u silosu mora uzorkovati i ne postoji mogućnost premještanja pošiljke, potrebno je s nositeljem djelatnosti sklopiti dogovor prema kojem je on ili ona dužan obavijestiti inspektora o tome kada će se silos istovariti kako bi se omogućilo uzorkovanje u trenutku kada je hrana za životinje u protoku.

8.4.2.2 *Silos kojemu se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine < 100 tona*

Postupak uzorkovanja uključuje ispuštanje u prijamni spremnik količine od 50 do 100 kg i uzimanje uzorka iz njega. Veličina skupnog uzorka odgovara čitavoj seriji, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu iz silosa puštenu u prijamni spremnik za uzorkovanje. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara zahtjevima EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

▼ **M3****8.5 Uzorkovanje hrane za životinje u rasutom stanju u zatvorenim posudama**

Takve serije često se mogu uzorkovati samo nakon istovara. U određenim slučajevima nije moguće obaviti istovar na mjestu utovara ili kontrole stoga se uzorkovanje obavlja pri istovaru tih posuda.

9. UPUTE ZA UZIMANJE, PRIPREMANJE I PAKIRANJE UZORAKA**9.1 Općenito**

Uzorci se moraju uzimati i pripremiti bez nepotrebnog odlaganja uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprečava promjena sastava ili kontaminacija proizvoda. Instrumenti, radne površine i posude za prihvata uzoraka moraju biti čisti i suhi.

9.2 Pojedinačni uzorci

Pojedinačni uzorci moraju se uzeti nasumično iz cijelog uzorka i moraju biti približno jednake veličine.

Veličina pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 grama ili 25 grama za vlaknastu krmu ili krmivo niske specifične težine.

Ako se u skladu s pravilima postupka uzorkovanja utvrđenima u točki 8. mora uzeti manje od 40 pojedinačnih uzoraka, veličina pojedinačnih uzoraka određuje se u funkciji potrebne veličine skupnog uzorka koji se mora postići (vidjeti točku 6).

U slučaju uzorkovanja malih serija pakirane hrane za životinje gdje je prema količinskim zahtjevima potrebno uzeti ograničen broj pojedinačnih uzoraka, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kg ili jednu litru.

U slučaju uzorkovanja pakirane hrane za životinje sastavljene od malih jedinica (npr. < 250 g), veličina pojedinačnog uzorka ovisi o veličini jedinice.

9.2.1 Hrana za životinje u rasutom stanju

Prema potrebi uzorkovanje se može izvesti pri premještanju uzorka (pri utovaru ili istovaru).

9.2.2 Pakirana hrana za životinje

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje u skladu s poglavljem 5., sandom ili lopaticom uzima se dio sadržaja svake jedinice. Prema potrebi, uzorci se mogu uzeti nakon odvojenog pražnjenja jedinica.

9.2.3 Homogenizirana ili za homogeniziranje primjerena tekuća ili polutekuća hrana za životinje

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje iz poglavlja 5., njihov se udio prema potrebi homogenizira i iz svake se jedinice uzima određena količina.

Pojedinačni se uzorci mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja spremnika.

▼ **M3****9.2.4 Tekuća ili polutekuća hrana za životinje koja nije prikladna za homogeniziranje**

Nakon odabira traženog broja jedinica za uzorkovanje iz poglavlja 5., uzorci se uzimaju s različitih razina.

Uzorci se mogu uzeti i za vrijeme pražnjenja udjela, ali se prva količina mora odbaciti.

U oba slučaja ukupni obujam ne smije biti manji od 10 litara.

9.2.5 Krmni blokovi ili kameni za lizanje

Nakon odabira traženog broja blokova ili kamena za lizanje namijenjenih uzorkovanju iz poglavlja 5. može se uzeti dio svakog bloka ili kamena za lizanje. U slučaju sumnje da blok ili kamen za lizanje nije prikladan za homogeniziranje, čitav blok ili kamen za lizanje može se uzeti kao uzorak.

Za četiri bloka ili kamena za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

9.3 Priprema skupnih uzoraka

Pojedinačni uzorci pomiješaju se tako da tvore skupni uzorak.

9.4 Priprema konačnih uzoraka

Materijal skupnog uzorka mora se pažljivo izmiješati ⁽¹⁾.

— Svaki se uzorak pohrani u prikladnu posudu/prijamni spremnik. Potrebno je poduzeti sve mjere opreza kako bi se tijekom prijevoza ili skladištenja spriječila promjena sastava uzorka, kontaminacija ili onečišćenje.

— U slučaju kontrole tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje, skupni uzorak može se reprezentativno smanjiti na najmanje 2,0 kg ili 2,0 litre (reducirani uzorak) ⁽²⁾, po mogućnosti mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Za kontrolu prisutnosti ostataka pesticida u mahunarkama, zrnima žitarica i orašastom voću, najmanja veličina reduciranog uzorka iznosi 3 kg. Ako svojstva hrane za životinje ne dozvoljavaju korištenje razdjelnika ili razdjelnik nije dostupan, uzorak se smanjuje četvrtanjem. Potom se iz smanjenih uzoraka pripreme konačni uzorci (za potrebe kontrole, prizivnog postupka i u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu s količinskim zahtjevima iz poglavlja 7. U slučaju kontrole proizvoda, uključujući genetski modificiranih materijala, ili tvari vjerojatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, skupni uzorak je:

— potpuno homogeniziran i naknadno razdijeljen u konačne uzorke ili

— reduciran na najmanje 2 kg ili 2 litre ⁽³⁾ mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Samo u slučaju kada svojstva hrane za životinje onemogućuju korištenje razdjelnika, uzorak se može po potrebi smanjiti četvrtanjem. Za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala u okviru Uredbe (EU) br. 619/2011, reducirani uzorak mora sadržavati najmanje 35 000 sjemenki/zrna kako bi se omogućilo dobivanje konačnih uzoraka za potrebe provedbe, prizivnog postupka i u referentne svrhe od najmanje 10 000 sjemenki zrna (vidjeti bilješku ^(*)) u poglavlju 6. i bilješku ^(*) u poglavlju 7.).

⁽¹⁾ Sve grude se razbiju (prema potrebi, tako da se odvoje i zatim vrate u uzorak).

⁽²⁾ Osim kod vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine.

⁽³⁾ Osim kod vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine.

▼ M3**9.5 Pakiranje uzoraka**

Posude ili pakiranja zapečaćeni su i označeni tako da ih nije moguće otvoriti bez oštećivanja pečata. Cijela etiketa mora biti uključena u pečat.

9.6 Slanje uzoraka u laboratorij

Uzorak se bez nepotrebnog odlaganja šalje u određeni analitički laboratorij, zajedno s podacima potrebnima analitičaru.

10. PODACI O UZORKOVANJU

O svakom uzorku moraju se voditi evidencije kako bi se svaki uzorkovani dio i njegova veličina mogao nedvojbeno prepoznati.

U evidencijama se također navodi svako odstupanje od postupka uzorkovanja predviđenog ovom Uredbom.

Osim stavljanja evidencija na raspolaganje službenom kontrolnom laboratoriju, evidencije se stavljaju na raspolaganje nositelju djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje i/ili laboratoriju koji je odredio nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje.

▼M3

PRILOG II.

OPĆE ODREDBE O ANALITIČKIM METODAMA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE

A. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

1. Svrha

U navedenim postupcima opisuje se priprema uzoraka za analizu, koji se šalju nadzornim laboratorijima nakon uzorkovanja provedenog u skladu s odredbama iz Priloga I.

Ti se laboratorijski uzorci moraju pripremiti tako da izvagane količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke, kako su predviđene za metode analize.

2. Mjere opreza

Postupak pripremanja uzoraka ovisi o analitičkim metodama koje se koriste te proizvodima i tvarima koji se kontroliraju. Stoga je vrlo važno osigurati da primijenjeni postupak za pripremanje uzorka bude primjeren analitičkoj metodi koja se koristi te proizvodima ili tvarima koji se kontroliraju.

Svi potrebni postupci moraju se provesti na način kojim se u najvećoj mogućoj mjeri sprečava kontaminacija i promjena sastava uzorka.

Mljevenje, miješanje i prosijavanje mora se vršiti bez odlaganja kako bi se uzorak čim manje izlagao zraku i svjetlu. Ne smiju se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak.

Preporuča se ručno mljevenje hrane za životinje koja je posebno osjetljiva na toplinu. Treba se pobrinuti da sama oprema ne bude izvor kontaminacije.

Ako se priprema ne može obaviti bez znatne promjene udjela vlage u uzorku, određuje se udio vode prije i nakon pripreme, u skladu s metodom utvrđenom u dijelu A Priloga III.

3. Postupak

3.1 Opći postupci

Testni alikvot uzima se iz konačnog uzorka. Ne preporuča se dijeljenje uzoraka metodom stožaste hrpe i četvrtanja jer se na taj način mogu dobiti testni alikvoti s visokom pogreškom dijeljenja.

3.1.1 Hrana za životinje koja se može samljeti bez dodatne obrade

— Prosijani konačni uzorak se promiješa i prikupi u prikladno čistu i suhu posudu s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu (testni alikvot), uzorak se ponovno promiješa kako bi se osigurala potpuna homogenizacija.

3.1.2 Hrana za životinje koja se može samljeti nakon sušenja

— Ako se u analitičkim metodama ne navodi drukčije, konačni uzorak se, u skladu s postupkom za prethodno sušenje iz točke 4.3. metode za određivanje udjela vlage iz dijela A Priloga III., suši, tako da se udio vode snizi na 8 % – 12 %. Zatim se nastavlja u skladu s točkom 3.1.1.

▼M3**3.1.3 Tekuća ili polutekuća hrana za životinje**

- Konačni uzorak se prikupi u prikladno čistu i suhu posudu s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu (testni alikvot), uzorak se temeljito promiješa kako bi se osigurala potpuna homogenizacija.

3.1.4 Ostala hrana za životinje

- Konačni uzorci koji se ne mogu pripremiti u skladu s jednim od gore navedenih postupaka obrađuju se bilo kojim drugim postupkom kojim se osigurava da je količina uzorka odvagana za analizu (testni alikvot) homogena i reprezentativna za konačne uzorke.

3.2 Posebni postupak pri provjeri vizualnom inspekcijom ili mikroskopijom ili kada je čitav skupni uzorak homogeniziran

- U slučaju provjere vizualnom inspekcijom (bez korištenja mikroskopa), za provjeru se koristi čitav laboratorijski uzorak.
- U slučaju mikroskopske provjere, u laboratoriju se može smanjiti skupni uzorak ili dodatno smanjiti reducirani uzorak. Konačni uzorci za potrebe prizivnog postupka i u referentne svrhe uzimaju se nakon postupka koji je jednak postupku koji se slijedi za konačni uzorak u provedbene svrhe.
- Ako je čitav skupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog skupnog uzorka.

4. Pohranjivanje uzoraka

Uzorci se moraju pohraniti na temperaturi koja neće promijeniti njihov sastav. Uzorci namijenjeni za analizu vitamina ili tvari posebno osjetljivih na svjetlost moraju se pohraniti u uvjetima u kojima uzorak nije pod štetnim utjecajem svjetla.

B. ODREDBE O REAGENSIMA I OPREMI KOJI SE KORISTE U ANALITIČKIM METODAMA

1. Ako se u analitičkim metodama ne navodi drukčije, svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (*pro analisi* (p.a.)). Kod analize tragova, čistoća reagensa mora se provjeriti slijepom probom. Ovisno o dobivenim rezultatima, može biti potrebno dodatno pročišćivanje reagensa.
2. Kod svih postupaka iz analitičkih metoda koji uključuju pripremanje otopina, razrjeđivanje, ispiranje ili pranje, a kod kojih se ne navodi vrsta korištenog otapala ili razrjeđivača, koristi se voda. U pravilu, voda mora biti demineralizirana ili destilirana. U posebnim slučajevima, navedenima u analitičkim metodama, vodu treba pročistiti posebnim postupcima.
3. S obzirom na opremu koja se uobičajeno nalazi u kontrolnim laboratorijima, u analitičkim se metodama navode samo posebni instrumenti i oprema ili oni koji zahtijevaju poseban način uporabe. Oni moraju biti čisti, posebno kod određivanja vrlo malih količina tvari.

▼ M3

C. PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA

1. **Postupak ekstrakcije**

U nekoliko metoda utvrđen je poseban postupak ekstrakcije. U pravilu se, osim postupka navedenog u metodi, mogu koristiti i drugi postupci ekstrakcije, pod uvjetom da je učinkovitost korištenog postupka ekstrakcije za analiziranu matricu dokazano jednakovrijedna postupku navedenom u metodi.

2. **Postupak pročišćivanja**

U nekoliko metoda utvrđen je poseban postupak pročišćivanja. U pravilu se, osim postupka navedenog u metodi, mogu koristiti i drugi postupci pročišćivanja, pod uvjetom da se korištenim postupkom pročišćivanja za analiziranu matricu dokazano postižu analitički rezultati jednakovrijedni postupku navedenom u metodi.

3. **Broj postupaka određivanja**

Kod analize nepoželjnih tvari, ako je rezultat prvog određivanja znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontrolira, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutarnje križne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za potvrdu sukladnosti koristi se srednja vrijednost dvaju određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

Pri kontroli označenog udjela tvari ili sastojka, ako se rezultatom prvog određivanja potvrdi označeni udio, tj. ako je rezultat analize unutar prihvatljivih granica odstupanja od označenog udjela, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutarnje križne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za potvrdu sukladnosti koristi se srednja se vrijednost dvaju određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

U nekim slučajevima ta prihvatljiva granica odstupanja definirana je u zakonodavstvu kao što je Uredba (EZ) br. 767/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 13. srpnja 2009. o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje, izmjeni Uredbe (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća i stavljanju izvan snage Direktive Vijeća 79/373/EEZ, Direktive Komisije 80/511/EEZ, Direktive Vijeća 82/471/EEZ, 83/228/EEZ, 93/74/EEZ, 93/113/EZ i 96/25/EZ te Odluke Komisije 2004/217EZ ⁽¹⁾.

4. **Izvjешćivanje o korištenoj analitičkoj metodi**

Korištena analitička metoda navodi se u izvješću o analizi.

5. **Izvjешćivanje o rezultatima analize**

Rezultat analize prikazuje se na način utvrđen analitičkom metodom, s primjerenim brojem značajnih znamenki, a prema potrebi se korigira s obzirom na udio vode u konačnom uzorku prije pripreme.

⁽¹⁾ SL L 229, 1.9.2009., str. 1.

▼ M3**6. Nesigurnost mjerenja i stupanj iskorištenja pri analizi nepoželjnih tvari**

U vezi s nepoželjnim tvarima u smislu Direktive 2002/32/EZ, smatra se da proizvod namijenjen za hranu za životinje nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom ako je rezultat analize, u odnosu na hranu za životinje s udjelom vode od 12 %, veći od najveće dopuštene količine, uzimajući u obzir proširenu nesigurnost mjerenja i korekciju za iskorištenje. Za ocjenu usklađenosti koristi se analizirana koncentracija nakon korekcije za iskorištenje i nakon oduzimanja proširene nesigurnosti mjerenja. Taj se postupak primjenjuje samo u slučajevima kada analitička metoda omogućuje procjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorištenje (na primjer, nije moguće u slučaju mikroskopske analize).

Rezultati analize iskazuju se na sljedeći način (ako korištena analitička metoda omogućuje ocjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorištenje):

- (a) s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi razina iskorištenja. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja između 90 % i 110 %.
- (b) kao „ $x \pm U$ ”, pri čemu je x rezultat analize, a U proširena nesigurnost mjerenja uz uporabu obuhvatnog faktora 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %.

Međutim, ako je rezultat analize znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontrolira i pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, rezultat analize može se iskazati bez korekcije za iskorištenje i u tim se slučajevima korekcija za iskorištenje i nesigurnost mjerenja mogu izostaviti.



PRILOG III.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU SASTAVA SIROVINA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE I KRMNIH SMJESA

A. ODREĐIVANJE VLAGE

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje udjela vlage u hrani za životinje. Kada hrana za životinje sadrži hlapljive tvari, poput organskih kiselina, treba uzeti u obzir da se pri određivanju vlage obuhvaća i znatna količina hlapljivih tvari.

Ova metoda ne obuhvaća analizu mliječnih proizvoda kao sirovina za hranu za životinje, analizu mineralnih tvari i smjesa sastavljenih uglavnom od mineralnih tvari, analizu životinjskih i biljnih masti i ulja ili analizu sjemenki uljarica i uljanog voća.

2. Načelo

Uzorak se osuši pod određenim uvjetima koji se mijenjaju ovisno o vrsti hrane za životinje. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem. Kod krute hrane za životinje s visokim udjelom vode potrebno je prethodno sušenje.

3. Oprema

3.1. Drobilica od materijala koji ne apsorbira vlagu i lako se čisti, omogućuje brzo i ravnomjerno drobljenje bez pretjeranog zagrijavanja, u najvećoj mogućoj mjeri sprečava kontakt s vanjskim zrakom te ispunjava zahtjeve iz točaka 4.1.1 i 4.1.2 (npr. udarne ili vodom hlađene mikrodrobilice, konusni mlinovi sa sklopivim konusima, spore drobilice ili drobilice sa zupčanicima).

3.2. Analitička vaga s preciznošću do 1 mg

3.3. Suhe posude od nehrđajuće kovine ili stakla s poklopcima koji omogućuju hermetičko zatvaranje; radna površina koja omogućuje rasprostiranje testnog uzorka na približno 0,3 g/cm².

3.4. Izotermičko sušilo (± 2 °C) s električnim grijanjem i primjerenim provjetranjem koje omogućuje brzu regulaciju temperature ⁽¹⁾.

3.5. Podesivo električno vakuumsko sušilo opremljeno uljnom crpkom i mehanizmom za dovod vrućeg suhog zraka ili sredstva za isušivanje (npr. kalcijevog oksida).

3.6. Eksikator s debelom metalnom ili porculanskom perforiranom pločom koja sadrži učinkovito sredstvo za isušivanje.

4. Postupak

Napomena: Postupci opisani u ovom odjeljku moraju se provesti odmah po otvaranju pakovina s uzorcima. Analiza se mora provesti najmanje dvaput zaredom.

⁽¹⁾ Za sušenje žitarica, brašna, grube krupice i sitne krupice sušilo mora imati takav toplinski kapacitet da se nakon postavljanja temperature na 131 °C vraća na tu temperaturu za manje od 45 minuta nakon što se u sušilo postavi maksimalan broj testnih uzoraka za istodobno sušenje. Ventilacija mora biti takva da se, u slučaju kada se u sušilu dva sata suši najveći mogući broj uzoraka pšenice, rezultati razlikuju za manje od 0,15 % od uzoraka koji su sušeni 4 sata.

▼B4.1. *Priprema*

4.1.1. Hrana za životinje osim one iz točaka 4.1.2 i 4.1.3

Uzme se najmanje 50 g uzorka. Prema potrebi se usitni ili razdjeli tako da se spriječi promjena udjela vlage (vidjeti točku 6).

4.1.2. Žitarice i gruba krupica

Uzme se najmanje 50 g uzorka. Uzorak se samelje tako da najmanje 50 % čestica prolazi kroz sito s oćicama veličine 0,5 mm, a na situ s okruglim oćicama veličine 1 mm ostane najviše 10 % čestica.

4.1.3. Tekuća ili kašasta hrana za životinje i hrana za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti

Odvagne se približno 25 g uzorka s preciznošću od 10 mg, doda se primjerena količina bezvodnog pijeska izvagana s preciznošću od 10 mg te se miješa dok se ne dobije homogena masa.

4.2. *Sušenje*

4.2.1. Hrana za životinje, osim one iz točaka 4.2.2. i 4.2.3.

Izvaže se posuda (točka 3.3.) s poklopcem s preciznošću od 1 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi. Posuda se bez poklopca stavi u sušilo prethodno zagrijano na 103 °C. Posuda se stavi u sušilo što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature. Sušenje traje četiri sata od trenutka kada temperatura u sušilu ponovno dosegne 103 °C. Posuda se pokrije poklopcem, izvadi iz sušila, ostavi hladiti u eksikatoru (točka 3.6.) 30 do 45 minuta i izvaže s preciznošću od 1 mg.

Hrana za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti suši se u sušilu dodatnih 30 minuta na 130 °C. Razlika između dvaju vaganja ne smije biti veća od 0,1 % vlage.

4.2.2. Žitarice, brašno, gruba krupica i sitna krupica

Izvaže se posuda (točka 3.3.) s poklopcem s preciznošću od 0,5 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi. Posuda se bez poklopca stavi u sušilo prethodno zagrijano na 130 °C. Posuda se stavi u sušilo što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature. Sušenje traje 2 sata od trenutka kada temperatura u sušilu ponovno dosegne 130 °C. Posuda se pokrije poklopcem, izvadi iz sušila, ostavi hladiti u eksikatoru (točka 3.6.) 30 do 45 minuta i izvaže s preciznošću od 1 mg.

4.2.3. Krmne smjese koje sadrže više od 4 % saharoze ili laktoze: sirovine za hranu za životinje poput rogača, hidroliziranih žitnih proizvoda, sjemena slada, sušene mljevene repe, ribe i otopine šećera; krmne smjese koje sadrže više od 25 % mineralnih soli, uključujući kristalnu vodu.

Izvaže se posuda (točka 3.3.) s poklopcem s preciznošću od 0,5 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi. Posuda se bez poklopca stavi u vakuumsko sušilo (točka 3.5.) prethodno zagrijano na 80 – 85 °C. Posuda se stavi u sušilo što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature.

Tlak se poveća na 100 torra i na tom se tlaku ostavi sušiti četiri sata na vrućem suhom zraku ili upotrebom sredstva za isušivanje (približno 300 g za 20 uzoraka). U potpunosti se slučaju vakuumska crpka isključi kad se dosegne traženi tlak. Vrijeme sušenja računa se od trenutka kada temperatura u sušilu ponovno dosegne 80 – 85 °C. Oprezno se izjednači tlak u sušilu s atmosferskim tlakom. Sušilo se otvori, posuda se odmah

▼B

pokrije poklopcem i izvadi iz sušila, ostavi se hladiti 30 do 45 minuta u eksikatoru (točka 3.6.) i izvaže s preciznošću od 1 mg. Suši se dodatnih 30 minuta u vakuumskom sušilu na 80 – 85 °C i ponovo važe. Razlika između dvaju vaganja ne smije biti veća od 0,1 % vlage.

4.3. *Prethodno sušenje*

4.3.1. Hrana za životinje, osim one iz točke 4.3.2.

Kruta hrana za životinje s visokim udjelom vode koja se teško drobi mora se prethodno sušiti na sljedeći način:

U prikladnu se posudu (npr. aluminijski tanjur veličine 20 × 12 cm s rubom 0,5 cm) odvagane 50 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 10 mg (sabijena ili zgusnuta hrana za životinje može se prema potrebi grubo razdijeliti). Ostavi se sušiti u sušilu na 60 – 70 °C, sve dok se udio vode ne smanji na 8 – 12 %. Posuda se izvadi iz sušila i jedan sat hladi bez poklopca u laboratoriju, zatim se izvaže s preciznošću od 10 mg. Hrana za životinje se odmah usitni, u skladu s točkom 4.1.1., i suši, u skladu s točkom 4.2.1. ili 4.2.3., ovisno o vrsti hrane za životinje.

4.3.2. *Žitarice*

Zrna sa udjelom vode većim od 17 % moraju se prethodno sušiti na sljedeći način:

U prikladnu se posudu (npr. aluminijski tanjur veličine 20 × 12 cm s rubom 0,5 cm) odvagane 50 g neusitnjenog zrnja s preciznošću od 10 mg. Ostavi se sušiti 5 do 7 minuta u sušilu na 130 °C. Posuda se izvadi iz sušila i 2 sata hladi bez poklopca u laboratoriju, zatim se izvaže s preciznošću od 10 mg. Odmah se usitni, u skladu s točkom 4.1.2., i osuši, u skladu s točkom 4.2.2.

5. **Izračun rezultata**

Udio vode (X), iskazan kao postotni dio uzorka, izračunava se sljedećom formulom:

5.1. *Sušenje bez prethodnog sušenja*

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

pri čemu je:

m = početna masa uzorka u gramima,
 m_0 = masa suhog uzorka u gramima.

5.2. *Sušenje s prethodnim sušenjem*

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

pri čemu je:

m = početna masa uzorka u gramima,
 m_1 = masa uzorka nakon prethodnog sušenja u gramima,
 m_2 = masa uzorka nakon usitnjavanja ili mljevenja u gramima,
 m_0 = masa suhog uzorka u gramima.

▼ B5.3. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prelaziti 0,2 % apsolutne vrijednosti vode.

6. **Napomena**

U slučaju kada je potrebno mljevenje za koje se pokaže da mijenja udio vode u proizvodu, potrebno je korigirati rezultate analize sastojaka hrane za životinje s obzirom na udio vode u uzorku u početnom stanju.

B. ODREĐIVANJE VODE U MASTIMA I ULJIMA ŽIVOTINJSKOG I BILJNOG PODRIJETLA

1. **Svrha i područje primjene**

Ova se metoda koristi za određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u mastima i uljima životinjskog i biljnog podrijetla.

2. **Načelo**

Uzorak se osuši do konstantne mase (gubitak mase između dvaju uzastopnih vaganja ne smije prijeći 1 mg) na 103 °C. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem.

3. **Oprema**

3.1. Posuda s ravnim dnom izrađena od nehrđajućeg materijala, promjera 8 do 9 cm i visine približno 3 cm.

3.2. Termometar s ojačanom kuglicom i ekspanzijskom komorom na gornjem dijelu, baždaren od približno 80 °C do najmanje 110 °C i duljine približno 10 cm.

3.3. Pješčana kupelj ili električna grijaća ploča

3.4. Eksikator s učinkovitim sredstvom za isušivanje

3.5. Analitička vaga

4. **Postupak**

Odvagne se približno 20 g homogeniziranog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u suhu izvaganu posudu (točka 3.1.) u kojoj se nalazi termometar (točka 3.2.). Zagrijava se na pješčanoj kupelji ili grijaćoj ploči (točka 3.3.) uz stalno miješanje termometrom, tako da temperatura dosegne 90 °C u približno 7 minuta.

Smanji se unos topline, pri čemu se nadzire učestalost podizanja mjehurića s dna posude. Temperatura ne smije prijeći 105 °C. Nastavi se miješati uz struganje dna posude sve dok ne prestane stvaranje mjehurića.

Kako bi se osiguralo potpuno uklanjanje vode, nekoliko puta se zagrije na 103 ± 2 °C uz hlađenje na 93 °C između uzastopnih zagrijavanja. Zatim se uzorak ostavi hladiti na sobnu temperaturu u eksikatoru (točka 3.4.) i izvaže. Postupak se ponavlja sve dok gubitak mase između dvaju uzastopnih vaganja ne bude manji od 2 mg.

Napomena: Povećanje mase uzorka nakon uzastopnog zagrijavanja upućuje na oksidaciju masti i u tom se slučaju rezultat izračunava na temelju vaganja izvedenog neposredno prije početka povećavanja mase.

5. **Izračun rezultata**

Udio vode (X), iskazan kao postotni dio uzorka, izračunava se sljedećom formulom:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

▼B

pri čemu je:

m = masa uzorka u gramima,

m_1 = masa posude sa sadržajem prije zagrijavanja, u gramima,

m_2 = masa posude sa sadržajem nakon zagrijavanja, u gramima.

Rezultati manji od 0,05 % navode se kao „manji od 0,05 %”.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 0,05 % apsolutne vrijednosti.

C. ODREĐIVANJE UDJELA SIROVIH BJELANČEVINA

1. Svrha i područje primjene

Ova se metoda koristi za određivanje udjela sirovih bjelančevina u hrani za životinje na temelju udjela dušika određenog Kjeldahlovom metodom.

2. Postupak

Uzorak se mineralizira sumpornom kiselinom u prisutnosti katalizatora. Kisela se otopina prevede u bazičnu dodavanjem otopine natrijevog hidroksida. Amonijak se destilira i prikupi u odmjerenoj količini sumporne kiseline, višak koje se titrira standardnom otopinom natrijevog hidroksida.

Druga je mogućnost destilacija oslobođenog amonijaka u višku otopine borne kiseline, nakon čega slijedi titriranje otopinom klorovodične ili sumporne kiseline.

3. Reagensi

- 3.1. Kalijev sulfat.
- 3.2. Katalizator: bakrov(II) oksid CuO ili bakrov(II) sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Cink u zrcima.
- 3.4. Sumporna kiselina, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Sumporna kiselina, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Sumporna kiselina, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Sumporna kiselina, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Indikator metil crvenilo; otopi se 300 mg metil crvenila u 100 ml etanola, $\sigma = 95 - 96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Otopina natrijevog hidroksida (moguća uporaba tehničke čistoće) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Natrijev hidroksid, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Natrijev hidroksid, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Plovućac u zrnu, ispran u klorovodičnoj kiselini i kalciniran.
- 3.13. Acetanilid (talište = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, udio N = 10,36 %).
- 3.14. Saharoza (bez dušika).
- 3.15. Borna kiselina (H_3BO_3).
- 3.16. Otopina indikatora metilnog crvenila: otopi se 100 mg metilnog crvenila u 100 ml etanola ili metanola.

▼B

- 3.17. Otopina bromkrezol zelenila: otopi se 100 mg bromkrezol zelenila u 100 ml etanola ili metanola.

- 3.18. Otopina borne kiseline (10 – 40 g/l, ovisno o opremi koja se koristi).

Kod metode kolorimetrijskog određivanja točke ekvivalencije, otopinama borne kiseline moraju se dodati indikatori metil crvenilo i bromkrezol zelenilo. Kod pripreme 1 litre otopine borne kiseline, prije prilagodbe volumena, doda se 7 ml otopine indikatora metil crvenila (točka 3.16.) i 10 ml otopine bromkrezol zelenila (točka 3.17.).

Ovisno o vodi koja se koristi, pH vrijednost otopine borne kiseline može se razlikovati od serije do serije. Za dobivanje pozitivne slijepe probe često treba izvesti prilagodbu malim volumenom alkalija.

Napomena: Obično je dovoljno dodati 3 do 4 ml NaOH (točka 3.11.) u 1 litru borne kiseline 10 g/l. Otopina se pohrani na sobnoj temperaturi i zaštititi od svjetla i para amonijaka.

- 3.19. Klorovodična kiselina, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{HCl}) = 0,10$ mol/l.

Napomena: Mogu se koristiti i druge koncentracije volumetrijskih otopina (točka 3.5., 3.6., 3.7., 3.10., 3.11. i 3.19.), ako se to uzima u obzir u izračunima. Koncentracije se uvijek navode na četiri decimalna mjesta.

4. **Oprema**

Uređaj prikladan za izvođenje postupaka mineralizacije, destilacije i titracije prema Kjeldahlovoj metodi.

5. **Postupak**

5.1. *Razgradnja*

Odvagne se 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u tikvicu naprave za mineralizaciju. Doda se 15 g kalijeveg sulfata (točka 3.1.), prikladna količina katalizatora (točka 3.2.) (0,3 – 0,4 g bakrovog(II) oksida ili 0,9 – 1,2 g bakrovog(II) sulfat pentahidrata), 25 ml sumporne kiseline (točka 3.4.), prema potrebi nekoliko zrnaca plovuća (točka 3.12.) i promiješa.

Tikvica se prvo umjereno zagrijava i prema potrebi povremeno trese, sve dok masa potpuno ne pougljeni i nestane pjena; zatim se jače zagrijava do ravnomjernog vrenja tekućine. Zagrijavanje je primjereno ako se vrela kiselina kondenzira na stijenkama tikvice. Treba spriječiti pregrijavanje stijenki i prianjanje organskih čestica na njih.

Kada se otopina razbistri i postane svijetlozelena, ostavi se da ključa još 2 sata, a zatim se ostavi da se ohladi.

5.2. *Destilacija*

Oprezno se doda dovoljna količina vode kako bi se sulfati potpuno otopili. Ostavi se da se ohladi i prema potrebi doda nekoliko zrnaca cinka (točka 3.3.). Nastavlja se u skladu s točkom 5.2.1. ili 5.2.2.

5.2.1. *Destilacija u sumpornoj kiselini*

U tikvicu za prikupljanje naprave za destilaciju doda se točno odmjerena količina od 25 ml sumporne kiseline (točka 3.5.) ili (točka 3.7.) ovisno o pretpostavljenom udjelu dušika. Doda se nekoliko kapi indikatora metil crvenila (točka 3.8.).

▼B

Tikvica za mineralizaciju priključi se na kondenzator naprave za destilaciju i vršak kondenzatora uroni u tekućinu u tikvici za prikupljanje, najmanje do dubine od 1 cm (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 8.3.). U tikvicu za mineralizaciju polagano se ulije 100 ml otopine natrijevog hidroksida (točka 3.9.) bez gubitka amonijaka (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 8.1.). Tikvica se zagrijava do potpune destilacije amonijaka.

5.2.2. Destilacija u bornoj kiselini

Kod ručne titracije amonijaka iz destilata koristi se dolje navedeni postupak. Kod destilacijskih jedinica koje su u potpunosti automatizirane i obuhvaćaju titraciju amonijaka iz destilata, postupak se prema uputama proizvođača za rukovanje destilacijskom jedinicom.

Tikvica za prikupljanje s 25 – 30 ml otopine borne kiseline (točka 3.18.) postavi se ispod izlaznog otvora kondenzatora tako da ispusna cijev bude ispod površine viška otopine borne kiseline. Destilacijska se jedinica namjesti tako da isporučuje 50 ml otopine natrijevog hidroksida (točka 3.9.). Destilacijskom se jedinicom rukuje u skladu s uputama proizvođača, a oslobođeni se amonijak destilira dodavanjem otopine natrijevog hidroksida. Destilat se prikupi u otopini borne kiseline. Količina destilata (vrijeme parne destilacije) ovisi o količini dušika u uzorku. Treba se pridržavati uputa proizvođača.

Napomena: U poluautomatskoj destilacijskoj jedinici dodavanje viška natrijevog hidroksida i parna destilacija automatizirani su postupci.

5.3. Titracija

Postupa se u skladu s točkom 5.3.1. ili 5.3.2.

5.3.1. Sumporna kiselina

Višak sumporne kiseline titrira se u tikvici za prikupljanje do točke ekvivalencije otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.10. ili 3.11.), ovisno o koncentraciji korištene sumporne kiseline.

5.3.2. Borna kiselina

Udio tikvice za prikupljanje titrira se standardnom volumetrijskom otopinom klorovodične kiseline (točka 3.19.) ili standardnom volumetrijskom otopinom sumporne kiseline (točka 3.6.), pri čemu se koristi bireta i očita se količina korištenog titranta.

Kod metode kolorimetrijskog određivanja točke ekvivalencije, točka ekvivalencije se dostiže kod prve pojave ružičastog obojenja udjela. Očita se obujam birete s preciznošću od 0,05 ml. Za pomoć kod vizualizacije točke ekvivalencije mogu se koristiti magnetna mješalica s osvjetljenjem ili fotometrijski detektor.

Ovaj se postupak može izvesti automatski upotrebom parnog destilatora s automatskom titracijom.

Kod rukovanja određenim tipom destilatora ili destilatora/titratora treba se pridržavati uputa proizvođača.

Napomena: Kod automatskog sustava titriranja, titracija započinje odmah po početku destilacije, a koristi se otopina borne kiseline 1 % (točka 3.18.).

▼B

Kod potpuno automatizirane destilacijske jedinice, postupak automatske titracije amonijaka može se izvoditi i određivanjem točke ekvivalencije metodom potenciometrijske titracije pH.

U tom se slučaju koristi automatski titrator s pH-metrom. Pravilno baždarenje pH metra izvodi se u području vrijednosti pH 4 do pH 7 uobičajenim laboratorijskim postupcima za baždarenje pH-metra.

Točka ekvivalencije pH titracije dosiže se pri pH 4,6, kada je nagib titracijske krivulje najviši (točka infleksije).

5.4. *Slijepa proba*

Kao potvrda da reagensi ne sadrže dušik koristi se slijepa proba (mineralizacija, destilacija i titracija), u kojoj se umjesto uzorka koristi 1 g saharoze (točka 3.14).

6. **Izračun rezultata**

Izračuni se izvode u skladu s točkom 6.1. ili 6.2.

6.1. *Izračun za titraciju u skladu s točkom 5.3.1.*

Udio sirovih bjelančevina, iskazan kao maseni postotak, izračunava se sljedećom formulom:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

pri čemu je:

V_0 = volumen (ml) NaOH (točka 3.10. ili 3.11.) korišten u slijepoj probi,

V_1 = volumen (ml) NaOH (točka 3.10. ili 3.11.) korišten kod titracije uzorka,

c = koncentracija (mol/l) natrijevog hidroksida (točka 3.10. ili 3.11.),

m = masa (g) uzorka.

6.2. *Izračun za titraciju u skladu s točkom 5.3.2.*

6.2.1. *Titracija klorovodičnom kiselinom*

Udio sirovih bjelančevina, iskazan kao maseni postotak, izračunava se sljedećom formulom:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

pri čemu je:

m = masa (g) uzorka,

c = koncentracija (mol/l) standardne volumetrijske otopine klorovodične kiseline (točka 3.19.),

V_0 = volumen (ml) klorovodične kiseline korišten u slijepoj probi,

V_1 = volumen (ml) klorovodične kiseline korišten u uzorkovanom dijelu.

6.2.2. *Titracija sa sumpornom kiselinom*

Udio sirovih bjelančevina, iskazan kao maseni postotak, izračunava se sljedećom formulom:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

▼B

pri čemu je:

m = masa (g) uzorka,

c = koncentracija (mol/l) standardne volumetrijske otopine sumporne kiseline (točka 3.6.),

V_0 = volumen (ml) sumporne kiseline (točka 3.6.) korišten u slijepoj probi,

V_1 = volumen (ml) sumporne kiseline (točka 3.6.) korišten u uzorkovanom dijelu.

7. **Provjera metode**

7.1. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 0,2 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina manji od 20 %,

— 1,0 % veće vrijednosti za udio sirovih bjelančevina u rasponu od 20 – 40 %,

— 0,4 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina veći od 40 %.

7.2. *Točnost*

Za analizu (mineralizacija, destilacija, titracija) koristi se 1,5 do 2,0 g acetanilida (točka 3.13.) u prisutnosti 1 g saharoze (točka 3.14.); za 1 g acetanilida koristi se 14,80 ml sumporne kiseline (točka 3.5.). Iskorištenje mora iznositi najmanje 99 %.

8. **Napomene**

8.1. Oprema može biti ručna, poluautomatska ili automatska. Ako je u radu naprave potreban prijelaz između mineralizacije i destilacije, taj se prijelaz mora izvesti bez gubitka. Ako tikvica naprave za destilaciju nije opremljena lijevkom za dokapavanje, natrijev se hidroksid dodaje neposredno prije priključivanja tikvice na kondenzator, pri čemu se tekućina ulijeva polako niz stijenke tikvice.

8.2. Ako se udio tikvice stvrđjava, postupak određivanja započinje se iznova, ali s količinom sumporne kiseline (točka 3.4.) većom od gore navedene.

8.3. Kod proizvoda s niskim udjelom dušika volumen sumporne kiseline (točka 3.7.) koji se dodaje u tikvicu za prikupljanje, prema potrebi se može smanjiti na 10 ili 15 ml, a tikvica se dopuni vodom do 25 ml.

8.4. Kod rutinske analize za određivanje sirovih bjelančevina mogu se koristiti zamjenske metode analize, iako je Kjeldahlova metoda, opisana u ovom dijelu C, referentna metoda. Za svaku matricu pojedinačno treba dokazati da su rezultati dobiveni zamjenskom metodom (npr. DUMAS) jednakovrijedni rezultatima dobivenim referentnom metodom. U izvješću o analizi treba navesti analitičku metodu korištenu za određivanje sirovih bjelančevina budući da rezultati dobiveni zamjenskom metodom, čak i nakon potvrde jednakovrijednosti, mogu odstupati od rezultata dobivenih referentnom metodom.

D. ODREĐIVANJE UREE

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine uree u hrani za životinje.

▼B**2. Načelo**

Uzorak se suspendira u vodi u prisutnosti tvari za bistrenje. Suspenzija se filtrira. Udio uree u filtratu određuje se nakon dodavanja 4-dimetilaminobenzaldehida (4-DMAB) mjerenjem optičke gustoće na valnoj duljini od 420 nm.

3. Reagensi

3.1. Otopina 4-dimetilaminobenzaldehida: otopi se 1,6 g 4-DMAB u 100 ml etanola 96 % i doda 10 ml klorovodične kiseline (ρ_{20} 1,19 g/ml). Taj se reagens može čuvati najviše dva tjedna.

3.2. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijevog ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Aktivni ugljen koji ne apsorbira ureu (treba provjeriti).

3.5. Urea, otopina 0,1 % (m/v).

4. Oprema

4.1. Mješalica (rotacijska): približno 35 do 40 okr./min.

4.2. Epruvete: 160 × 16 mm s ubrušenim čepovima.

4.3. Spektrofotometar

5. Postupak**5.1. Analiza uzorka**

Odvagne se 2 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese s 1 g aktivnog uglja (točka 3.4.) u graduiranu tikvicu obujma 500 ml. Doda se 400 ml vode i 5 ml otopine Carrez I (točka 3.2.), miješa približno 30 sekundi i doda 5 ml otopine Carrez II (točka 3.3.). Miješa se 30 minuta u mješalici. Dopuni se vodom do oznake, protrese i filtrira.

Uzme se 5 ml prozirnog bezbojnog filtrata i prenese u epruvete s ubrušenim čepovima, doda se 5 ml otopine 4-DMAB (točka 3.1.) i promiješa. Epruvete se postave u vodenu kupelj na 20 °C (+/- 4 °C). Nakon 15 minuta spektrofotometrom se izmjeri optička gustoća otopine uzorka na 420 nm. Rezultat se usporedi s otopinom reagensa iz slijepe probe.

5.2. Kalibracijska krivulja

Uzme se 1, 2, 4, 5 i 10 ml otopine uree (točka 3.5.) i prenese u odmjerne tikvice obujma 100 ml koje se dopune vodom do oznake. Iz svake se otopine odstrani 5 ml, te se u svaku doda 5 ml otopine 4-DMAB (točka 3.1.), homogenizira i izmjeri optička gustoća, kako je gore navedeno, u usporedbi s kontrolnom otopinom koja sadrži 5 ml 4-DMAB i 5 ml vode bez uree. Pripremi se kalibracijska krivulja.

6. Izračun rezultata

Količina uree u uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. Napomene

7.1. Ako udio uree prelazi 3 %, uzorak se smanji na 1 g ili se početna otopina razrijedi tako da u 500 ml nema više od 50 mg uree.

▼B

- 7.2. Ako je udio uree nizak, uzorak se povećava sve dok je filtrat proziran i bezbojan.
- 7.3. Ako uzorak sadrži jednostavne dušične spojeve, poput aminokiselina, optička se gustoća mjeri na 435 nm.

E. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH DUŠIKOVIH BAZA**I. MIKRODIFUZIJA****1. Svrha i područje primjene**

Ova se metoda koristi za određivanje udjela hlapljivih dušikovih baza u hrani za životinje iskazanog kao amonijak.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira vodom, a otopina se izbistri i filtrira. Hlapljive dušične baze istiskuju se mikrodifuzijom uporabom otopine kalijevog karbonata, prikupe u otopinu borne kiseline i titiraju sumpornom kiselinom.

3. Reagensi

- 3.1. Trikloroctena kiselina, otopina 20 % (m/v).
- 3.2. Indikator: otopi se 33 mg bromkrezol zelenila i 65 mg metilnog crvenila u 100 ml etanola 95 – 96 % (v/v).
- 3.3. Otopina borne kiseline: u odmjernoj tikvici volumena od 1 litre otopi se 10 g borne kiseline u 200 ml etanola 95 – 96 % (v/v) i 700 ml vode. Doda se 10 ml indikatora (točka 3.2.). Promiješa se, a prema potrebi boja otopine promijeni u svijetlo crvenu dodavanjem otopine natrijevog hidroksida. Količina od 1 ml te otopine vezat će najviše 300 µg NH₃.
- 3.4. Zasićena otopina kalijevog karbonata: u 100 ml vrele vode otopi se 100 g kalijevog karbonata. Ostavi se da se ohladi, a zatim se filtrira.
- 3.5. Sumporna kiselina, 0,01 mol/l.

4. Oprema

- 4.1. Mješalica (rotacijska): približno 35 do 40 okr./min.
- 4.2. Stakleni ili plastični Conwayevi članci (vidjeti dijagram).
- 4.3. Mikrobirete graduirane s podjelom 1/100 ml.

5. Postupak

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 ml vode u graduiranu tikvicu obujma 200 ml. Trese se ili miješa 30 minuta u rotacijskoj mješalici. Doda se 50 ml otopine trikloroctene kiseline (točka 3.1.), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i filtrira kroz nabrani filter.

Pipetom se doda 1 ml otopine borne kiseline (točka 3.3.) u srednji dio Conwayevog članka i 1 ml filtrata uzorka u gornji dio članka. Djelomično se pokrije namašćenim poklopcem. U gornji dio članka brzo se nakapa 1 ml zasićene otopine kalijevog karbonata (točka 3.4.) i poklopac hermetički zatvori. Članak se oprezno okreće u vodoravnoj ravnini tako da se reagensi pomiješaju. Ostavi se najmanje četiri sata na sobnoj temperaturi ili jedan sat na temperaturi 40 °C.

Mikrobiretom (točka 4.3.) se hlapljive baze u otopini borne kiseline titiraju sumpornom kiselinom (točka 3.5.).

Slijepa se proba izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

▼B**6. Izračun rezultata**

1 ml H_2SO_4 0,01 mol/l odgovara 0,34 mg amonijaka.

Rezultat analize iskazuje se kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

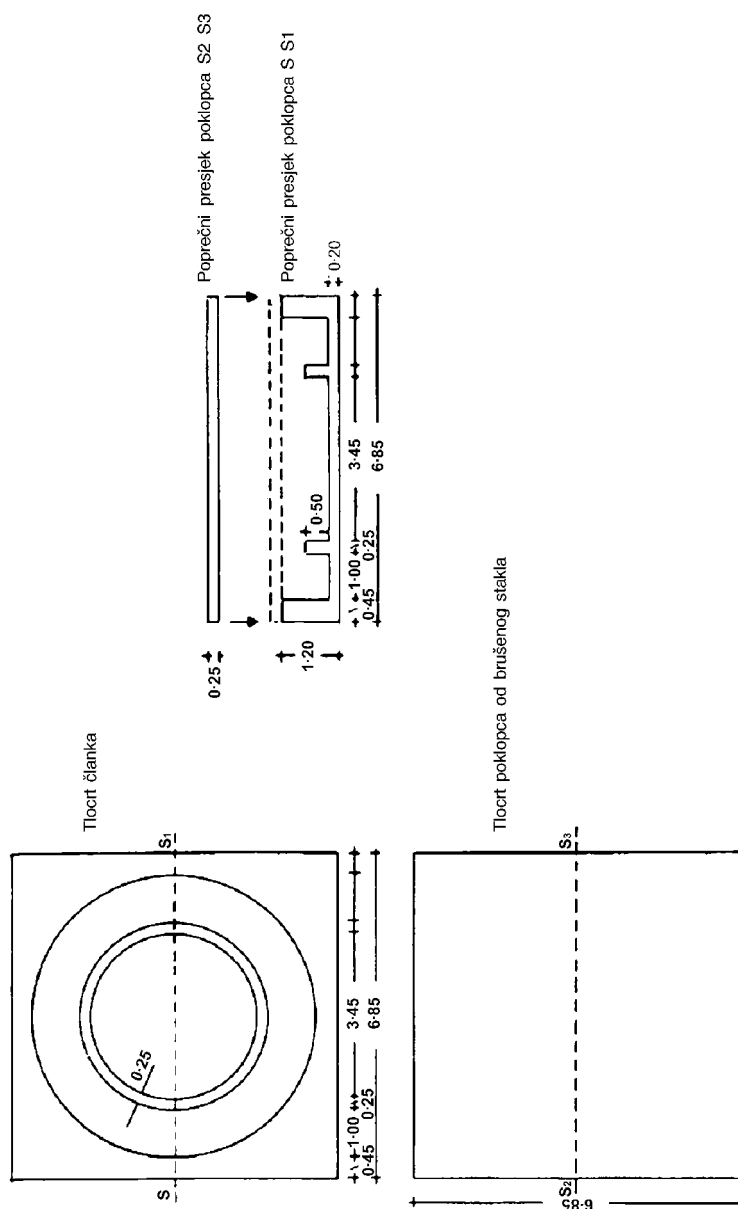
- 10 % relativne vrijednosti za udio amonijaka manji od 1,0 %,
- 0,1 % apsolutne vrijednosti za udio amonijaka 1,0 % ili veći.

7. Napomena

Ako je udio amonijaka u uzorku veći od 0,6 % početni se filtrat razrijedi.

CONWAYEV ČLANAK

Omjer 1/1



▼B**II. DESTILACIJA****1. Svrha i područje primjene**

Ova se metoda koristi za određivanje udjela hlapljivih dušikovih baza, iskazanih kao amonijak, u ribljem brašnu koje praktično ne sadrži ureu. Koristi se samo za udio amonijaka niži od 0,25 %.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira vodom, a otopina izbistri i filtrira. Hlapljive dušične baze se istisnu na temperaturi vrelišta dodavanjem magnezijevog oksida i prikupe u određenoj količini sumporne kiseline, višak koje se titrira otopinom natrijevog hidroksida.

3. Reagensi

- 3.1. Trikloroctena kiselina, otopina 20 % (m/v).
- 3.2. Magnezijev oksid.
- 3.3. Emulzija protiv pjenjenja (npr. silikon).
- 3.4. Sumporna kiselina, 0,05 mol/l.
- 3.5. Otopina natrijevog hidroksida, 0,1 mol/l.
- 3.6. Otopina metilnog crvenila 0,3 % u etanolu 95 % – 96 % (v/v).

4. Oprema

- 4.1. Mješalica (rotacijska): približno 35 do 40 okr./min.
- 4.2. Uređaj za destilaciju po Kjeldahlu.

5. Postupak

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 ml vode u građiranu tikvicu obujma 200 ml. Trese se ili miješa 30 minuta u rotacijskoj mješalici. Doda se 50 ml otopine trikloroctene kiseline (točka 3.1.), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i filtrira kroz nabrani filter papir.

Pipetom se prenese količina bistrog filtrata koja odgovara očekivanom sadržaju hlapljivih dušikovih baza (obično je dovoljno 100 ml). Razrijedi se na 200 ml, doda se 2 g magnezijevog oksida (točka 3.2.) i nekoliko kapljica emulzije protiv pjenjenja (točka 3.3.). Otopina mora biti alkalna pri pokusu s lakmusovim papirom; ako to nije slučaj, doda se magnezijev oksid (točka 3.2.). Postupa se u skladu s točkama 5.2. i 5.3. metode analize za određivanje udjela sirovih bjelančevina (dio C ovog Priloga).

Slijepa se proba izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

6. Izračun rezultata

1 ml H₂SO₄ 0,05 mol/l odgovara 1,7 mg amonijaka.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 10 % relativne vrijednosti amonijaka.

F. ODREĐIVANJE AMINOKISELINA (OSIM TRIPTOFANA)**1. Svrha i područje primjene**

Ova se metoda koristi za određivanje slobodnih (sintetičkih i prirodnih) i ukupnih (vezanih na peptide i slobodnih) aminokiselina u hrani za životinje pomoću analizatora aminokiselina. Koristi se za sljedeće aminokiseline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, aspartatna

▼B

kiselina, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin.

Ovom se metodom ne mogu razlikovati soli aminokiselina niti je moguće utvrditi razliku između oblika D i L aminokiselina. Ova metoda nije primjerena za određivanje triptofana ili hidroksi-analoga aminokiselina.

2. Načelo

2.1. Slobodne aminokiseline

Slobodne aminokiseline ekstrahiraju se razrijeđenom klorovodičnom kiselinom. Koekstrahirane dušične makromolekule istalože se sulfosalicilnom kiselinom i uklone filtriranjem. Vrijednost pH filtrirane otopine podesi se na 2,20. Aminokiseline se razdvoje ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i odrede reakcijom s ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm.

2.2. Ukupne aminokiseline

Odabir postupka ovisi o ispitivanim aminokiselinama. Cist(e)in i metionin se prije hidrolize moraju oksidirati u cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon. Tirozin se mora odrediti u hidrolizatima neoksidiranih uzoraka. Sve druge aminokiseline navedene u točki 1 mogu se odrediti u oksidiranom ili neoksidiranom uzorku.

Oksidacija se izvodi na 0 °C mješavinom peroksimravlje kiseline i fenola. Višak oksidacijskog reagensa razgradi se natrijevim disulfitom. Oksidirani ili neoksidirani uzorak se 23 sata hidrolizira klorovodičnom kiselinom (točka 3.20.). Vrijednost pH hidrolizata podesi se na 2,20. Aminokiseline se razdijele ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i odrede reakcijom s ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm (440 nm za prolin).

3. Reagensi

Obvezno se koristi dvostruko destilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost < 10 µS)

- 3.1. Vodikov peroksid, m (m/m) = 30 %.
- 3.2. Mravlja kiselina, m (m/m) = 98 % – 100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Natrijev disulfit.
- 3.5. Natrijev hidroksid.
- 3.6. 5-sulfosalicilna kiselina dihidrat.
- 3.7. Klorovodična kiselina, gustoće približno 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinatrij citrat dihidrat.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).
- 3.10. Natrijev klorid.
- 3.11. Ninhidrin.
- 3.12. Lagani petrolej, vrelište 40 – 60 °C.
- 3.13. Norleucin ili drugi spoj primjeren za uporabu kao interni standard

▼B

- 3.14. Plinoviti dušik (< 10 ppm kisika).
- 3.15. 1-oktanol.
- 3.16. Aminokiseline.
- 3.16.1. Standardne tvari iz točke 1. Čisti spojevi koji ne sadrže kristalnu vodu. Prije uporabe suše se 1 tjedan pod vakuumom s P_2O_5 ili H_2SO_4 .
- 3.16.2. Cisteinska kiselina.
- 3.16.3. Metionin-sulfon.
- 3.17. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 7,5$ mol/l:
U vodi se otopi 300 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.18. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 1$ mol/l:
U vodi se otopi 40 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.19. Mravlja kiselina – otopina fenola:
Pomiješa se 889 g mravlje kiseline (točka 3.2.) sa 111 g vode i doda 4,73 g fenola (točka 3.3.).
- 3.20. Smjesa za hidrolizu, $c = 6$ mol HCl/l koja sadrži 1 g fenola/l:
Doda se 1 g fenola (točka 3.3.) u 492 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.21. Smjesa za ekstrakciju, $c = 0,1$ mol HCl/l koja sadrži 2 % tiodiglikola: 8,2 ml HCl (točka 3.7.) se razrijedi s približno 900 ml vode, doda se 20 ml tiodiglikola (točka 3.9.) i dopuni vodom do 1 litre (ne smiju se izravno miješati tvari iz točaka 3.7. i 3.9.).
- 3.22. 5-sulfosalicilna kiselina, $\beta = 6$ %:
U vodi se otopi 60 g 5-sulfosalicilne kiseline (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.23. Oksidacijska smjesa (peroksimravlja kiselina – fenol):
Pomiješa se 0,5 ml vodikovog peroksida (točka 3.1.) s 4,5 ml otopine mravlje kiseline i fenola (točka 3.19.) u maloj čaši. Inkubira se 1 sat na 20 – 30 °C kako bi se dobila peroksimravlja kiselina, zatim se hladi u ledenoj kupelji (15 min) prije dodavanja u uzorak.
Upozorenje: Izbjegavati dodir s kožom i nositi zaštitnu odjeću.
- 3.24. Citratni pufer, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:
U približno 800 ml vode otopi se 19,61 g natrijevog citrata (točka 3.8.), 5 ml tiodiglikola (točka 3.9.), 1 g fenola (točka 3.3.) i 16,50 ml HCl (točka 3.7.). Vrijednost pH se podesi na 2,20. Dopuni se vodom do 1 litre.
- 3.25. Puferi za eluiranje, pripremljeni u skladu s uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9.).
- 3.26. Reagens ninhidrin, pripremljen u skladu s uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9.).
- 3.27. Standardne otopine aminokiselina. Ove se otopine drže na temperaturi nižoj od 5 °C.

▼B

- 3.27.1. Osnovna standardna otopina aminokiselina (točka 3.16.1.).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ za svaku u klorovodičnoj kiselini.

Može se nabaviti u slobodnoj prodaji.

- 3.27.2. Osnovna standardna otopina cisteinske kiseline i metionin-sulfona, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

U odmjernoj tikvici obujma 1 l otopi se 0,2115 g cisteinske kiseline (točka 3.16.2.) i 0,2265 g metionin-sulfona (točka 3.16.3.) u citratnom puferu (točka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do oznake. Može se pohraniti najviše 12 mjeseci na temperaturi nižoj od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ova se otopina ne koristi ako osnovna standardna otopina (točka 3.27.1.) sadrži cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon.

- 3.27.3. Osnovna standardna otopina internog standarda, npr. norleucina, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

U odmjernoj se tikvici otopi 0,6560 g norleucina (točka 3.13.) u citratnom puferu (točka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do 250 ml. Može se pohraniti najviše 6 mjeseci na temperaturi nižoj od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 3.27.4. Kalibracijska otopina standardnih aminokiselina koja se koristi s hidrolizatima, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ za cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon i $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ za druge aminokiseline. U čaši obujma 100 ml otopi se 2,2 g natrijevog klorida (točka 3.10.) s 30 ml citratnog pufera (točka 3.24.). Doda se 4,00 ml osnovne standardne otopine aminokiselina (točka 3.27.1.), 4,00 ml osnovne standardne otopine cisteinske kiseline i metionin-sulfona (točka 3.27.2.) i 0,50 ml osnovne standardne otopine internog standarda (točka 3.27.3.) ako se isti koristi. Vrijednost pH se natrijevim hidroksidom podesi na 2,20 (točka 3.18.).

Udio se kvantitativno prenese u graduiranu tikvicu obujma 50 ml, dopuni citratnim puferom (točka 3.24.) do oznake i promiješa.

Pohrani se najviše 3 mjeseca na temperaturi nižoj od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vidjeti također napomenu pod točkom 9.1.

- 3.27.5. Pripremi se kalibracijska otopina standardnih aminokiselina koja se koristi s hidrolizatima u skladu s točkom 5.3.3.1., a za ekstrakte u skladu s točkom 5.2. Kalibracijska otopina se pripremi u skladu s točkom 3.27.4., ali bez natrijevog klorida.

Pohrani se najviše 3 mjeseca na temperaturi nižoj od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. **Oprema**

- 4.1. Tikvica s okruglim dnom volumena 100 ili 250 ml s povratnim hladilom.
- 4.2. Staklena posuda od borosilikatnog stakla obujma 100 ml s navojnim čepom obloženim gumom/teflonom (npr. Duran, Schott) za uporabu u sušilu.
- 4.3. Sušilo s prisilnom ventilacijom i regulatorom temperature točnosti veće od $\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.4. pH metar (na tri decimalna mjesta).
- 4.5. Membranski filter ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$).
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Rotacijski vakuumski otparivač.
- 4.8. Mehanička tresilica ili magnetska mješalica.

▼B

- 4.9. Analizator aminokiselina ili oprema za HPLC opremljena kolonom za izmjenu iona, napravom za ninhidrin i derivatizaciju nakon kolone te fotometrijskim detektorom.

Kolona se napuni smolama sulfoniranog polistirena koje mogu razdvajati aminokiseline jedne od drugih i od drugih materijala koji reagiraju na ninhidrin. Tok u puferskoj i ninhidrinskoj liniji osigurava se crpkama s tokom stabilnosti $\pm 0,5$ % u vremenu koje obuhvaća izvođenje standardnog kalibriranja i analizu uzorka.

Kod nekih analizatora aminokiselina mogu se koristiti postupci hidrolize kod kojih je koncentracija natrija u hidrolizatu $c = 0,8$ mol/l, a hidrolizat sadrži svu ostatnu mravlju kiselinu iz oksidacije. Drugim metodama ne postiže se zadovoljavajuće razdvajanje nekih aminokiselina ako se u hidrolizatu nalazi višak mravlje kiseline i/ili visoka koncentracija natrijevih iona. U tom se slučaju obujam kiseline nakon hidrolize i prije podešavanja pH smanjuje isparavanjem na približno 5 ml. Isparavanje se vrši pod vakuumom na najviše 40 °C.

5. **Postupak**

5.1. *Priprema uzorka*

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine 0,5 mm. Uzorci s visokim udjelom vode moraju se prije mljevenja osušiti na zraku na temperaturi koja ne prelazi 50 °C ili smrzavanjem. Uzorci s visokim sadržajem masti ekstrahiraju se laganim petrolejem (točka 3.12.) prije mljevenja.

5.2. *Određivanje slobodnih aminokiselina u hrani za životinje i premiksima*

Odvagne se primjerena količina (1 – 5 g) pripravljenog uzorka (točka 5.1.) s preciznošću od 0,2 mg i prenese u konusnu tikvicu, te se doda 100,0 ml smjese za ekstrakciju (točka 3.21.). Smjesa se 60 minuta trese mehaničkom tresilicom ili magnetskom mješalicom (točka 4.8.). Pričeka se da talog padne na dno i pipetom prenese 10,0 ml supernatanta u čašu obujma 100 ml.

Tijekom miješanja doda se 5,0 ml otopine sulfosalicilne kiseline (točka 3.22.) i nastavi 5 minuta miješati magnetskom mješalicom. Supernatant se filtrira ili centrifugira kako bi se uklonio cjelokupni talog. U čašu obujma 100 ml izlije se 10,0 ml dobivene otopine i vrijednost pH podesi na 2,20 otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18.), prenese citratnim puferom (točka 3.24.) u građiranu tikvicu primjerenog obujma i dopuni otopinom pufera (točka 3.24.) do oznake.

Ako se koristi interni standard, za svakih 100 ml konačne otopine doda se 1,00 ml internog standarda (točka 3.27.3.) i dopuni otopinom pufera (točka 3.24.) do oznake.

Nastavlja se s kromatografijom u skladu s točkom 5.4.

Ako se ekstrakti ne pregledavaju isti dan, moraju se pohraniti na temperaturi nižoj od 5 °C.

5.3. *Određivanje ukupnih aminokiselina*

5.3.1. *Oksidacija*

Odvagne se 0,1 – 1 g pripravljenog uzorka (točka 5.1.) s preciznošću od 0,2 mg i prenese u:

— tikvicu s okruglim dnom volumena 100 ml (točka 4.1.) za otvorenu hidrolizu (točka 5.3.2.3.) ili,

▼B

- tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml (točka 4.1.) ako se zahtijeva niska koncentracija natrija (točka 5.3.3.1.) ili,
- staklenu bocu s navojnim čepom volumena 100 ml (točka 4.2.) za zatvorenu hidrolizu (točka 5.3.2.4.).

U odvaganom dijelu uzorka udio dušika mora iznositi približno 10 mg, a udio vode ne smije biti veći od 100 mg.

Tikvica/boca se postavi u ledenu kupelj i ohladi na 0 °C, doda se 5 ml oksidacijske smjese (točka 3.23.) i miješa staklenom lopaticom sa zakrivljenim vrhom. Tikvica/boca s lopaticom se hermetički zatvori filmom, a ledena kupelj s hermetički zatvorenom posudom stavi u hladnjak na 0 °C i ostavi 16 sati. Nakon 16 sati posuda se izvadi iz hladnjaka, a višak oksidacijskog reagensa se razgradi dodavanjem 0,84 g natrijevog disulfita (točka 3.4.).

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.2.1.

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. *Hidroliza oksidiranih uzoraka*

U oksidirani uzorak, pripremljen u skladu s točkom 5.3.1., doda se 25 ml smjese za hidrolizu (točka 3.20.), pri čemu treba brižljivo isprati sve ostatke uzorka sa stijenke posude i lopatice.

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.2.3. ili 5.3.2.4., ovisno o korištenom postupku hidrolize.

5.3.2.2. *Hidroliza neoksidiranih uzoraka*

U tikvicu s okruglim dnom obujma 100 ml ili 250 ml (točka 4.1.) ili u bocu s navojnim čepom obujma 100 ml (točka 4.2.) odvagane se 0,1 – 1 g pripremljenog uzorka (točka 5.1.) s preciznošću od 0,2 mg. U odvaganom dijelu uzorka udio dušika mora iznositi približno 10 mg. Oprezno se doda 25 ml smjese za hidrolizu (točka 3.20.) i pomiješa s uzorkom. Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.2.3. ili 5.3.2.4.

5.3.2.3. *Otvorena hidroliza*

U smjesu koja se nalazi u tikvici (pripremljenu u skladu s točkom 5.3.2.1. ili 5.3.2.2.) dodaju se 3 staklene kuglice, zatim se ostavi ključati 23 sata uz stalno vrenje pod refluksom. Po završetku hidrolize kondenzator ispere se s 5 ml citratnog pufera (točka 3.24.). Tikvica se odvoji i ohladi u ledenoj kupelji.

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.3.

5.3.2.4. *Zatvorena hidroliza*

Boca sa smjesom pripremljenom u skladu s točkom 5.3.2.1. ili 5.3.2.2. postavi se u sušilo (točka 4.3.) na temperaturi od 110 °C. Kako bi se tijekom prvog sata spriječilo povećanje tlaka i eksplozija (zbog nastanka plinovitih tvari), poklopac s navojem treba postaviti na vrh posude. Posuda se ne smije zatvoriti poklopcem. Nakon jednog sata posuda se zatvori poklopcem i ostavi 23 sata u sušilu (točka 4.3.). Po završetku hidrolize boca se izvadi iz sušila, oprezno se otvori poklopac boce i boca položi u ledenu kupelj. Ostavi se da se ohladi.

Ovisno o postupku podešavanja pH (točka 5.3.3.) udio posude se citratnim puferom (točka 3.24.) kvantitativno prenese u čašu obujma 250 ml ili tikvicu s okruglim dnom obujma 250 ml.

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.3.

▼B**5.3.3. Podešavanje pH**

Ovisno o odstupanju analizatora aminokiselina (točka 4.9.) za natrij, podešavanje pH se provodi u skladu s točkom 5.3.3.1. ili 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Kromatografski sustavi (točka 4.9.) koji zahtijevaju nisku koncentraciju natrija*

Pri upotrebi analizatora aminokiselina koji zahtijevaju nisku koncentraciju natrija (kada treba smanjiti volumen kiseline) preporučuje se uporaba otopine internog osnovnog standarda (točka 3.27.3.).

U tom se slučaju hidrolizatu prije otparivanja dodaje 2,00 ml otopine internog osnovnog standarda (točka 3.27.3.).

U hidrolizat dobiven postupkom u skladu s točkom 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. dodaje se 2 kapljice 1-oktanol (točka 3.15.).

Obujam se smanji na 5 – 10 ml rotacijskim otparivačem (točka 4.7.) pod vakuumom na 40 °C. Ako se obujam slučajno smanji na manje od 5 ml, hidrolizat se mora odbaciti i iznova započeti analizu.

Otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18.) vrijednost pH podesi se na 2,20 i zatim nastavi u skladu s točkom 5.3.4.

5.3.3.2. *Za sve druge analizatore aminokiselina (točka 4.9.)*

Hidrolizati dobiveni u skladu s točkom 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. djelomično se neutraliziraju opreznim dodavanjem, uz miješanje, 17 ml otopine natrijevog hidroksida (točka 3.17.), pri čemu se temperatura mora održavati na manje od 40 °C.

Na sobnoj temperaturi podesi se vrijednost pH na 2,20 otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.17.) i zatim otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18.). Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.4.

5.3.4. Otopina uzorka za kromatografiju

Hidrolizat (točka 5.3.3.1. ili 5.3.3.2.) s podešenom vrijednosti pH, citratnim se puferom (točka 3.24.) kvantitativno prenese u graduiranu tikvicu obujma 200 ml i dopuni puferom (točka 3.24.) do oznake.

Ako dotada nije korišten interni standard, doda se 2,00 ml internog standarda (točka 3.27.3.) i zatim dopuni citratnim puferom (točka 3.24.) do oznake. Temeljito se promiješa.

Nastavlja se s kromatografijom (točka 5.4.).

Ako se otopine uzorka ne pregledavaju isti dan, moraju se pohraniti na temperaturi nižoj od 5 °C.

5.4. *Kromatografija*

Prije kromatografije temperaturu ekstrakta (točka 5.2.) ili hidrolizata (točka 5.3.4.) treba izjednačiti sa sobnom temperaturom. Smjesa se protrese i prikladna količina filtrira kroz membranski filter 0,22 µm (točka 4.5.). Dobivena bistra otopina se podvrgne kromatografiji s izmjenom iona uporabom analizatora aminokiselina (točka 4.9.).

Ubrizgavanje se može izvesti ručno ili automatski. Važno je na kolonu za analizu standarda i uzoraka dodati istu količinu otopine ($\pm 0,5$ %) osim kada se koristi interni standard, a omjeri natrija i aminokiselina u otopinama standarda i uzorka trebaju biti što je moguće sličniji.

▼B

Općenito učestalost kalibriranja ovisi o stabilnosti reagensa ninhidrina i sustava za analizu. Standard ili uzorak se razrijedi citratnim puferom (točka 3.24.) tako da površina vršaka standarda dostiže 30 – 200 % površine vršaka aminokiselina u uzorku.

Kromatografija aminokiselina neznatno se razlikuje s obzirom na vrstu korištenog analizatora i smole. Odabrani sustav mora imati mogućnost razdvajanja aminokiselina međusobno i od drugih materijala koji reagiraju na ninhidrin. U radnom području kromatografski sustav mora imati linearan odziv na promjene količina aminokiselina dodanih u kolonu.

U fazi kromatografije primjenjuju se dolje navedeni omjeri između najnižih i najviših vrijednosti kod analize ekvimolarnih otopina (aminokiselina koje se određuju). Ekvimolarna otopina mora sadržavati najmanje 30 % maksimalnog udjela svake aminokiseline koji se može točno izmjeriti sustavom za analizu aminokiselina (točka 4.9.).

Kod postupka razdvajanja treonina od serina, omjer između najniže i najviše vrijednosti za aminokiselinu s nižom vrijednosti između dviju aminokiselina koje se preklapaju na kromatogramu ne smije prijeći 2:10. (Ako se određuju samo cist(e)in, metionin, treonin i lizin, nedovoljno razdvajanje između susjednih vršaka štetno će djelovati na postupak određivanja). Za sve druge aminokiseline razdvajanje mora biti veće od 1:10.

Sustav mora jamčiti razdvajanje lizina od „lizinskih artefakata” i ornitina.

6. Izračun rezultata

Za svaku pojedinačnu aminokiselinu izmjeri se površina vršaka uzorka i standarda, a količina (X), iskazana u g aminokiseline na kg uzorka, izračunava se na sljedeći način:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Ako se koristi interni standard pomnoži se s: $\frac{D}{C}$

- A = površina vršaka hidrolizata ili ekstrakta
- B = površina vršaka standardne kalibracijske otopine
- C = površina vršaka hidrolizata ili ekstrakta kao internog standarda
- D = površina vršaka standardne kalibracijske otopine kao internog standarda
- M = molarna masa aminokiseline koja se određuje
- c = koncentracija standarda u $\mu\text{mol/ml}$
- m = masa uzorka u gramima (ispravljena na početnu masu ako je uzorak isušen ili odmašćen)
- V = ml ukupnog hidrolizata (točka 5.3.4.) ili izračunani ukupni volumen otopine ekstrakta (točka 6.1.) u ml

Cistin i cistein se određuju kao cisteinska kiselina u hidrolizatima oksidiranog uzorka, ali se izračunavaju kao cistin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) uporabom molarne mase 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metionin se određuje kao metionin-sulfon u hidrolizatima oksidiranog uzorka, ali se izračunava kao metionin uporabom molarne mase metionina: 149,21 g/mol.

▼B

Dodani slobodni metionin određuje se nakon ekstrakcije kao metionin, a za izračun se koristi ista molekulska masa.

- 6.1. Ukupni volumen otopine ekstrakata (F) za određivanje slobodnih amino-kiselina (točka 5.2.) izračunava se sljedećom formulom:

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

V = volumen konačnog ekstrakta

7. **Vrednovanje metode**

Metoda je provjerena u međulaboratorijskom ispitivanju na međunarodnoj razini provedenom 1990. na četiri različite vrste hrane za životinje (miješana hrana za svinje, smjesa za brojler, proteinski koncentrat, premiks). Rezultati srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, bez ekstremnih vrijednosti, prikazani su u tablicama u ovoj točki:

Srednje vrijednosti u g/kg

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Smjesa za brojler	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinski koncentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = Broj uključenih laboratorija.

7.1. *Ponovljivost*

Ponovljivost gore navedene međulaboratorijske usporedbe, iskazana kao „unutarlaboratorijska standardna devijacija”, prikazana je u donjim tablicama:

Unutarlaboratorijska standardna devijacija (S_r), iskazana u g/kg

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Smjesa za brojler	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinski koncentrat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiks	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = Broj uključenih laboratorija.

▼ B**Koeficijent varijacije (%) za unutarlaboratorijsku standardnu devijaciju (S_r)**

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Smjesa za broj- lere	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinski koncentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = Broj uključenih laboratorija.

7.2. *Ponovljivost*

Rezultati gore navedene međulaboratorijske usporedbe, iskazani kao standardna devijacija između laboratorija, prikazani su u donjoj tablici:

Standardna devijacija između laboratorija (S_R) u g/kg

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Smjesa za broj- lere	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinski koncentrat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiks	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = Broj uključenih laboratorija.

Koeficijent varijacije (%) za standardnu devijaciju između laboratorija (S_R)

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Smjesa za broj- lere	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinski koncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = Broj uključenih laboratorija.

▼B**8. Upotreba referentnih materijala**

Pravilna primjena metode provjerava se ponovljenim mjerenjima na certificiranim referentnim materijalima, kada su dostupni. Preporučuje se izvršiti kalibraciju upotrebom certificirane otopine za kalibraciju aminokiselina.

9. Napomene

- 9.1. Zbog razlika između analizatora aminokiselina, kao smjernice se uzimaju konačne koncentracije otopina standardnih aminokiselina za kalibraciju (vidjeti točke 3.27.4. i 3.27.5.) i hidrolizata (vidjeti točku 5.3.4.).

Za sve aminokiseline treba provjeriti područje linearnog odziva uređaja.

Standardna se otopina razrijedi citratnim puferom tako da se površine vršaka nalaze u sredini područja.

- 9.2. Kada se za analizu hidrolizata koristi oprema za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti, uvjeti pokusa se moraju optimizirati u skladu s preporukama proizvođača.

- 9.3. Kod primjene metode za hranu za životinje koja sadrži više od 1 % klorida (koncentrat, mineralna hrana za životinje, dodaci hrani za životinje) može doći do preniske procjene udjela metionina, što zahtijeva posebnu obradu.

G. ODREĐIVANJE TRIPTOFANA**1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje ukupnog i slobodnog triptofana u hrani za životinje. Njom se ne omogućuje razlikovanje između oblika D i L.

2. Načelo

Za određivanje ukupnog triptofana uzorak se hidrolizira u bazičnim uvjetima zasićenom otopinom barijevog hidroksida i 20 sati grije na 110 °C. Nakon hidrolize dodaje se interni standard.

Za određivanje slobodnog triptofana uzorak se ekstrahira u lagano kiselim uvjetima u prisutnosti internog standarda.

Triptofan i interni standard u hidrolizatu ili ekstraktu određuju se postupkom HPLC s fluorescentnom detekcijom.

3. Reagensi

- 3.1. Obvezno se koristi redestilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost < 10 µS/cm).
- 3.2. Standardna tvar: triptofan (čistoća/udio ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosforog pentoksida.
- 3.3. Interna standardna tvar: α-metil-triptofan (čistoća/udio ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosforog pentoksida.
- 3.4. Barijev hidroksid oktahidrat (treba paziti da se Ba(OH)₂·8 H₂O pretjerano ne izlaže zraku kako bi se izbjeglo nastajanje BaCO₃ koji može remetiti postupak određivanja) (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 9.3.).
- 3.5. Natrijev hidroksid.
- 3.6. Ortofosforna kiselina, m (m/m) = 85 %.
- 3.7. Klorovodična kiselina, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, za HPLC.
- 3.9. Lagani petrolej, raspon vrelišta 40 – 60 °C.

▼B

- 3.10. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- U vodi se otopi 40,0 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre (točka 3.1.).
- 3.11. Klorovodična kiselina, $c = 6 \text{ mol/l}$:
- Uzme se 492 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.12. Klorovodična kiselina, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- Uzme se 82 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.13. Klorovodična kiselina, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
- Uzme se 8,2 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.14. Ortofosforna kiselina, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
- Uzme se 34 ml ortofosforne kiseline (točka 3.6.) i dopuni vodom (točka 3.1.) do 1 litre.
- 3.15. Koncentrirana otopina triptofana (točka 3.2.), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- U odmjernoj tikvici obujma 500 ml otopi se 0,2553 g triptofana (točka 3.2.) u klorovodičnoj kiselini (točka 3.13.) i dopuni klorovodičnom kiselinom (točka 3.13.) do oznake. Pohrani se najviše 4 tjedna na $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.16. Koncentrirana otopina internog standarda, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- U odmjernoj tikvici obujma 500 ml otopi se 0,2728 g α -metil-triptofana (točka 3.3.) u klorovodičnoj kiselini (točka 3.13.) i dopuni klorovodičnom kiselinom (točka 3.13.) do oznake. Pohrani se najviše 4 tjedna na $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.17. Standardna otopina triptofana i internog standarda za kalibraciju:
- Pripremi se 2,00 ml koncentrirane otopine triptofana (točka 3.15.) i 2,00 ml koncentrirane otopine internog standarda (α -metil-triptofan) (točka 3.16.). Razrijedi se vodom (točka 3.1.) i metanolom (točka 3.8.) na približno jednak obujam i približno jednaku koncentraciju metanola (10 – 30 %) kao kod konačnog hidrolizata.
- Ta se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.
- Tijekom pripreme treba je zaštititi od izravnog sunčevog svjetla.
- 3.18. Octena kiselina.
- 3.19. 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamin, $m \text{ (m/m)} > 98 \text{ } \%$.
- 3.21. Otopina 1 g 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.) u 100 ml metanola (točka 3.8.).
- 3.22. Mobilna faza za HPLC: 3,00 g octene kiseline (točka 3.18.) + 900 ml vode (točka 3.1.) + 50,0 ml otopine (točka 3.21.) 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.) u metanolu (točka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanolaminom (točka 3.20.) se vrijednost pH podesi na 5,00. Dopuni se vodom (točka 3.1.) do 1 000 ml.

4. Oprema

- 4.1. Oprema za HPLC sa spektrofotometrijskim detektorom.
- 4.2. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 125 mm $\times$ 4 mm C_{18} , veličina čestica punjenja 3 μm ili jednakovrijedna.
- 4.3. pH metar.
- 4.4. Polipropilenska tikvica, obujma 125 ml, sa širokim vratom i navojnim čepom.

▼B

- 4.5. Membranski filter, 0,45 µm.
- 4.6. Autoklav, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Mehanička tresilica ili magnetska mješalica.
- 4.8. Vrtložna mješalica.

5. Postupak**5.1. Priprema uzoraka**

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine 0,5 mm. Uzorci s visokim udjelom vode moraju se prije usitnjavanja osušiti na zraku na temperaturi koja ne prelazi 50 °C ili liofilizacijom. Uzorci s visokim sadržajem masti ekstrahiraju se laganim petrolejem (točka 3.9.) prije usitnjavanja.

5.2. Određivanje slobodnog triptofana (ekstrakt)

Odvagne se primjerena količina (1 – 5 g) pripremljenog uzorka (točka 5.1.) s preciznošću od 1 mg i prenese u konusnu tikvicu. Doda se 100,0 ml klorovodične kiseline (točka 3.13.) i 5,00 ml koncentrirane otopine internog standarda (točka 3.16.). Trese se ili miješa 60 minuta mehaničkom tresilicom ili magnetskom mješalicom (točka 4.7.). Pričeka se da talog padne na dno i pipetom prenese 10,0 ml supernatanta u čašu. Doda se 5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.14.). Natrijevim hidroksidom (točka 3.10.) se pH vrijednost otopine podesi na 3. Doda se dovoljno metanola (točka 3.8.) kako bi u konačnom volumenu koncentracija metanola iznosila 10 – 30 %. Prenese se u građuiranu tikvicu primjerenog volumena i razrijedi vodom na volumen potreban za kromatografiju (približno jednak volumen kao kod standardne kalibracijske otopine (točka 3.17.)).

Prije ubrizgavanja na kolonu za HPLC filtrira se nekoliko ml otopine kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.5.). Nastavlja se s kromatografijom u skladu s točkom 5.4.

Standardna otopina i ekstrakti se zaštite od izravnog sunčevog svjetla. Ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se pohraniti na temperaturi od 5 °C na razdoblje od najviše 3 dana.

5.3. Određivanje ukupnog triptofana (hidrolizat)

Odvagne se 0,1 – 1 g pripremljenog uzorka (točka 5.1.) s preciznošću od 0,2 mg i prenese u polipropilensku tikvicu (točka 4.4.). Udio dušika u odvaganom dijelu uzorka mora iznositi približno 10 mg. Doda se 8,4 mg barijevog hidroksid oktahidrata (točka 3.4.) i 10 ml vode. Miješa se vrtložnom mješalicom (točka 4.8.) ili magnetskom mješalicom (točka 4.7.). U smjesi se ostavi magnet obložen teflonom. Stijenke posude se isperu s 4 ml vode. Tikvica se poklopi navojnim čepom i lagano zatvori. Prenese se u autoklav (točka 4.6.) s vrelom vodom i ostavi u pari 30 – 60 minuta. Autoklav se zatvori i 20 sati autoklavira na 110 (± 2) °C.

Prije otvaranja autoklava, temperatura se snizi na malo ispod 100 °C. Kako bi se spriječila kristalizacija Ba(OH)₂·8 H₂O, u toplu se smjesu doda 30 ml vode temperature okoliša. Lagano se protrese ili promiješa. Doda se 2,00 ml koncentrirane otopine internog standarda (α-metil-triptofana) (točka 3.16.). Posude se 15 minuta hlade u vodenoj/ledenoj kupelji.

Zatim se doda 5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.14.). Posuda se drži u rashladnoj kupki i uz miješanje neutralizira s HCl (točka 3.11.), a pH vrijednost se podesi na 3,0 s HCl (točka 3.12.). Doda se dovoljno metanola kako bi u konačnom obujmu koncentracija metanola iznosila 10 – 30 %. Prenese se u građuiranu tikvicu primjerenog obujma i razrijedi vodom do obujma potrebnog za kromatografiju (na primjer, 100 ml). Dodavanje metanola ne smije izazvati taloženje.

▼B

Prije ubrizgavanja na HPLC kolonu nekoliko ml otopine se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.5.). Nastavlja se s kromatografijom u skladu s točkom 5.4.

Standardna otopina i hidrolizati se zaštite od izravnog sunčevog svjetla. Ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se pohraniti na temperaturi od 5 °C na razdoblje od najviše 3 dana.

5.4. *Određivanje HPLC-om*

Za izokratsko se eluiranje kao smjernice predlažu sljedeći uvjeti; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati (vidjeti također napomene pod točkama 9.1. i 9.2.).

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 3 µm ili jednakovrijedna
Temperatura kolone:	sobna temperatura
Mobilna faza (točka 3.22.):	3,00 g octene kiseline (točka 3.18.) + 900 ml vode (točka 3.1.) + 50,0 ml otopine točka (točka 3.21.) 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.) u metanolu (točka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanolaminom (točka 3.20.) se pH vrijednost otopine podesi na 5,00. Dopuni se vodom (točka 3.1.) do 1 000 ml.
Brzina protoka:	1 ml/min
Ukupno trajanje eluiranja:	oko 34 min
Valna duljina detekcije:	ekscitacija: 280 nm, emisija: 356 nm.
Volumen za ubrizgavanje:	20 µl

6. **Izračun rezultata**

Količina triptofana (X), iskazana u g na 100 g uzorka, izračunava se sljedećom formulom:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = površina vrška internog standarda, standardna kalibracijska otopina (točka 3.17.)

B = površina vrška triptofana, ekstrakt (točka 5.2.) ili hidrolizat (točka 5.3.)

V₁ = obujam, u ml (2 ml), koncentrirana otopina triptofana (točka 3.15.) dodana kalibracijskoj otopini (točka 3.17.)

c = koncentracija, u µmol/ml (= 2,50), koncentrirana otopina triptofana (točka 3.15.) dodana kalibracijskoj otopini (točka 3.17.)

V₂ = obujam, u ml, koncentrirana otopina internog standarda (točka 3.16.) dodana pri ekstrakciji (točka 5.2.) (= 5,00 ml) ili hidrolizat (točka 5.3.) (= 2,00 ml)

C = površina vrška internog standarda, ekstrakt (točka 5.2.) ili hidrolizat (točka 5.3.)

D = površina vrška triptofana, standardna kalibracijska otopina (točka 3.17.)

V₃ = obujam, u ml (= 2,00 ml), koncentrirane otopine internog standarda (točka 3.16.), dodana standardnoj kalibracijskoj otopini (točka 3.17.)

m = masa uzorka u g (korigirana na izvornu masu ako je uzorak isušen i/ili odmašćen)

M = molarna masa triptofana (= 204,23 g/mol).

7. **Ponovljivost**

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 10 % u odnosu na najviši rezultat.

▼B**8. Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija na razini EZ-a (četvrta međulaboratorijska usporedba), u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo 3 uzorka za potvrđivanje metode za hidrolizu. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

	Uzorak 1 Hrana za svinje	Uzorak 2 Hrana za svinje s dodanim L-triptofanom	Uzorak 3 Koncentrat hrane za svinje
L	12	12	12
n	50	55	50
Srednja vrijednost [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 = broj laboratorija koji su dostavili rezultate

n = broj korištenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identificiranih Cochran-Dixonovim testom za ekstremne vrijednosti)

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

r = ponovljivost

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EZ-a (treća međulaboratorijska usporedba), u kojoj se u 13 laboratorija analiziralo 2 uzorka za potvrđivanje metode za ekstrakciju slobodnog triptofana. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

	Uzorak 4 Smjesa pšenice i soje	Uzorak 5 Smjesa pšenice i soje (= uzorak 4) s dodanim triptofanom (0,457 g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Srednja vrijednost [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 = broj laboratorija koji su dostavili rezultate

n = broj korištenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identificiranih Cochran-Dixonovim testom za ekstremne vrijednosti)

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

r = ponovljivost

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

▼B

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EZ-a u kojoj se u 7 laboratorija analiziralo 4 uzorka za potvrđivanje triptofana za hidrolizu. Rezultati su prikazani dolje. Svaki se uzorak analizirao pet puta.

	Uzorak 1 Miješana hrana za svinje (CRM 117)	Uzorak 2 Riblje brašno s niskim udjelom masti (CRM 118)	Uzorak 3 Sojino brašno (CRM 119)	Uzorak 4 Obrano mlije- ko u prahu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Srednja vrijed- nost [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 = broj laboratorija koji su dostavili rezultate

n = broj korištenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identificiranih Cochran-Dixonovim testom za ekstremne vrijednosti)

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

r = ponovljivost

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

9. Napomene

- 9.1. Bolje razdvajanje triptofana i α -metil-triptofana može se postići sljedećim kromatografskim uvjetima.

Izokratsko eluiranje, nakon kojeg slijedi gradijentno pročišćivanje kolone:

Kolona za tekućinsku kromatografiju: 125 mm × 4 mm, C_{18} , veličina čestica punjenja 5 μ m ili

jednakovrijedna Temperatura kolone: 32 °C

Mobilna faza: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metanol, 95 + 5 (V + V).
B: Metanol

Gradijentni program:	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

Brzina protoka: 1,2 ml/min

Ukupno trajanje eluiranja: oko 33 min

- 9.2. Postupak kromatografije se razlikuje s obzirom na vrstu HPLC-a i korišteni materijal za punjenje kolone. Odabrani sustav mora osiguravati razdvajanje bazne linije triptofana i internog standarda. Osim toga, važno je dobro odijeliti produkte razgradnje od triptofana i internog standarda. Izvede se postupak s hidrolizatima bez internog standarda za provjeru bazne linije internog standarda na nečistoće. Važno je da

▼B

vrijeme eluiranja bude dovoljno za eluiranje svih produkata razgradnje, inače bi zakašnjeni vršci eluiranja mogli remetiti kasnije postupke kromatografiranja.

U radnom području kromatografski sustav mora imati linearni odziv. Linearni se odziv mjeri s konstantnom (uobičajenom) koncentracijom internog standarda i različitim koncentracijama triptofana. Važno je da veličine vršaka triptofana i internog standarda budu u linearnom području sustava za HPLC/fluorescenciju. Ako su vršci triptofana i/ili internog standarda preniski ili previsoki, analizu treba ponoviti s drugom količinom uzorka i/ili drugim konačnim obujmom.

9.3. *Barijev hidroksid*

S vremenom se topljivost barijevog hidroksida smanjuje. Posljedica toga je mutna otopina za HPLC, što može dovesti do niskih rezultata za triptofan.

H. ODREĐIVANJE SIROVIH ULJA I MASTI

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje udjela sirovih ulja i masti u hrani za životinje. Ona ne obuhvaća analizu sjemenki uljarica i uljnog voća.

Primjena dolje navedenih postupaka ovisi o vrsti i sastavu hrane za životinje i razlogu za provedbu analize.

1.1. *Postupak A – Sirova ulja i masti koje se ekstrahiraju izravno*

Ova se metoda koristi za hranu za životinje biljnog podrijetla, osim one koja je obuhvaćena područjem primjene postupka B.

1.2. *Postupak B – Ukupna sirova ulja i masti*

Ova se metoda koristi za hranu za životinje životinjskog podrijetla i za sve krmne smjese. Koristi se za sve sirovine za dobivanje životinjske hrane iz kojih se bez prethodne hidrolize ne mogu potpuno ekstrahirati ulja i masti (npr. gluteni, kvasac, krumpirovi proteini i proizvodi koji se podvrgavaju postupcima poput istiskivanja, pahuljičanja i zagrijavanja).

1.3. *Tumačenje rezultata*

Kada je rezultat dobiven postupkom B viši od rezultata dobivenog postupkom A uvijek se kao točna vrijednost uzima rezultat dobiven postupkom B.

2. **Načelo**

2.1. *Postupak A*

Uzorak se ekstrahira laganim petrolejem. Otapalo se ukloni destilacijom, a ostatak osuši i izvaže.

2.2. *Postupak B*

Uzorak se uz zagrijavanje obradi klorovodičnom kiselinom. Smjesa se ohladi i filtrira. Ostatak se ispere i osuši, a zatim se provede određivanje u skladu s postupku A.

▼B**3. Reagensi**

- 3.1. Lagani petrolej, raspon vrelišta 40 – 60 °C. Bromni broj mora biti niži od 1, a ostatak nakon isparavanja manji od 2 mg/100 ml.
- 3.2. Natrijev sulfat, bezvodni.
- 3.3. Klorovodična kiselina, $c = 3 \text{ mol/l}$.
- 3.4. Filtracijsko sredstvo, npr. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Oprema

- 4.1. Uređaj za ekstrakciju. Ako je opremljena sifonom (uređaj Soxhlet), brzina refluksa mora biti takva da proizvodi približno 10 ciklusa na sat; ako nije opremljena sifonom, brzina povratnog toka mora iznositi približno 10 ml na minutu.
- 4.2. Kartuše za ekstrakciju, bez tvari topljivih u laganom petroleju i poroznosti u skladu s zahtjevima iz točke 4.1.
- 4.3. Sušilo, bilo vakuumsko, postavljeno na $75 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$, ili zračno, postavljeno na $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

5. Postupak**5.1. Postupak A (vidjeti točku 8.1.)**

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg, prenese u kartušu za ekstrakciju (točka 4.2.) i pokrije čepom od vate koji ne sadrži masti.

Kartuša se postavi u ekstraktor (točka 4.1.) i šest sati ekstrahira laganim petrolejem (točka 3.1.). Ekstrakt laganog petroleja se prikupi u suhu, izvaganu tikvicu koja sadrži krhotine plovuće⁽¹⁾.

Otapalo se ukloni destilacijom. Ostatak se osuši tako da se tikvica sat i pol drži u sušilu (točka 4.3.). Ostavi se da se ohladi u eksikatoru te se izvaže. Ponovo se suši 30 minuta kako bi se osigurala konstantna masa ulja i masti (gubitak mase između dvaju uzastopnih vaganja ne smije prijeći 1 mg).

5.2. Postupak B

Odvagne se 2,5 g uzorka s preciznošću od 1 mg (vidjeti točku 8.2.), prenese u čašu obujma 400 ml ili konusnu tikvicu obujma 300 ml i doda 100 ml klorovodične kiseline (točka 3.3.) i krhotine plovuće. Čaša se pokrije satnim staklom ili se konusna tikvica spoji s kondenzatorom s povratnim protokom. Smjesa se polagano dovede do ključanja iznad niskog plamena ili na električnoj grijaćoj ploči i tamo ostavi jedan sat. Treba paziti da se uzorak ne zalijepi za stijenke posude.

Ohladi se i doda onoliko sredstva za filtriranje (točka 3.4.) koliko je potrebno da tijekom filtriranja ne dođe do gubitka ulja i masti. Filtrira se kroz navlažen dvostruki filter papir koji ne sadrži masti. Ostatak se ispire hladnom vodom sve dok filtrat ne postane neutralan. Treba provjeriti da filtrat ne sadrži nikakva ulja ili masti. Njihova prisutnost znači da se uzorak prije hidrolize mora ekstrahirati laganim petrolejem primjenom postupka A.

Dvostruki filter papir na kojem je ostatak prenese se na satno staklo i sat i pol suši u sušilu (točka 4.3.) na $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

⁽¹⁾ Kada se ulje ili mast podvrgavaju naknadnim testovima kakvoće, krhotine plovuće zamjenjuju se staklenim kuglicama.

▼B

Dvostruki filter papir sa suhim ostatkom se prenese u kartušu za ekstrakciju (točka 4.2.) i pokrije čepom od vate koji ne sadrži masti. Kartuša se postavi u ekstraktor (točka 4.1.) i postupak nastavi kako je navedeno u drugom i trećem stavku točke 5.1.

6. **Prikaz rezultata**

Masa ostatka iskazuje se kao postotni udio uzorka.

7. **Ponovljivost**

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja koja na istom uzorku izvodi isti analitičar ne smije prijeći:

— 0,2 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih ulja i masti manje od 5 %,

— 4,0 % višeg rezultata za udio od 5 – 10 %,

— 0,4 % apsolutne vrijednosti za udio iznad 10 %.

8. **Napomene**

- 8.1. Kod proizvoda s visokim udjelom ulja i masti koji se teško usitnjavaju ili nisu primjereni za pripremanje homogenog smanjenog pokusnog uzorka primjenjuje se sljedeći postupak.

Odvagne se 20 g uzorka s preciznošću od 1 mg i pomiješa s 10 g ili više bezvodnog natrijevog sulfata (točka 3.2.). Ekstrahira se laganim petrolejem (točka 3.1.) u skladu s točkom 5.1. Ekstrakt se dopuni laganim petrolejem (točka 3.1.) do 500 ml i promiješa. Uzme se 50 ml otopine i prenese u malenu, suhu, izvaganu tikvicu s krhotinama plovuća. Destilacijom se ukloni otapalo, osuši se i nastavi u skladu s zadnjem stavku točke 5.1.

Iz ostatka ekstrakcije koji se nalazi u tuljcu ukloni se otapalo, ostatak se usitni do veličine čestica 1 mm i vrati u tuljac za ekstrakciju (ne dodaje se natrijev sulfat), zatim se nastavi kako je navedeno u drugom i trećem stavku točke 5.1.

Udio ulja i masti kao postotni udio uzorka izračunava se sljedećom formulom:

$$(10 m_1 + m_2) \times 5$$

pri čemu je:

m_1 = masa ostatka nakon prve ekstrakcije (aliquotni dio ekstrakta) u gramima,

m_2 = masa ostatka nakon druge ekstrakcije u gramima.

- 8.2. Kod proizvoda s niskim sadržajem ulja i masti pokusni se uzorak može povećati na 5 g.
- 8.3. Hranu za kućne ljubimce s visokim sadržajem vode ponekad prije hidrolize i ekstrakcije trebati pomiješati s bezvodnim natrijevim sulfatom, u skladu s postupku B.
- 8.4. U točki 5.2, za ispiranje ostatka nakon filtracije učinkovitije bi bilo koristiti vruću vodu umjesto hladne vode.
- 8.5. Za određenu hranu za životinje možda će trebati produžiti vrijeme sušenja na više od 1,5 h. Treba izbjegavati prekomjerno sušenje zato što može dovesti do niskih rezultata. Može se koristiti i mikrovalna pećnica.

▼B

- 8.6. Ako je udio sirovih ulja/masti viši od 15 %, preporučuje se prije hidrolize izvesti prethodnu ekstrakciju u skladu s postupku A i ponovnu ekstrakciju u skladu s postupku B. U određenoj mjeri, to ovisi o vrsti hrane za životinje i vrsti ulja/masti u hrani za životinje.

I. ODREĐIVANJE SIROVE VLAKNINE**1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje bezmasnih organskih tvari u hrani za životinje koje su netopljive u kiselim i baznim medijima i uobičajeno se nazivaju sirove vlaknine.

2. Načelo

Uzorak se prema potrebi odmasti i uzastopno obradi vrelinama sumporne kiseline i kalijevog hidroksida u navedenim koncentracijama. Ostatak se odvaja filtracijom kroz filter od sinteriranog stakla, ispere, osuši, izvaže i žari na 475 – 500 °C. Gubitak mase zbog žarenja odgovara udjelu sirove vlaknine u pokusnom uzorku.

3. Reagensi

- 3.1. Sumporna kiselina, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Sredstvo protiv pjenjenja (npr. n-oktanol).
- 3.3. Sredstvo za filtriranje (Celite 545 ili jednakovrijedno), koje se četiri sata grije na 500 °C (točka 8.6.).
- 3.4. Aceton.
- 3.5. Lagani petrolej s rasponom vrelišta od 40 – 60 °C.
- 3.6. Klorovodična kiselina, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Oprema

- 4.1. Grijaća jedinica za mineralizaciju otopinama sumporne kiseline i kalijevog hidroksida, opremljena dodatkom za filterski lončić (točka 4.2.) i ispusnom cijevi koja je preko slavine priključena na tekućinu i vakuum, po mogućnosti sa stlačenim zrakom. Svakog dana prije početka upotrebe jedinica se pet minuta zagrijava vrelinom vodom.
- 4.2. Stakleni filterski lončić s filterskom pločom od sinteriranog stakla, veličine pora 40 – 90 μm . Prije prve upotrebe treba se nekoliko minuta grijati na 500 °C i ohladiti (točka 8.6.).
- 4.3. Valjak obujma najmanje 270 ml s kondenzatorom s povratnim protokom, pogodan za ključanje.
- 4.4. Sušilo s termostatom
- 4.5. Mufolna peć s termostatom
- 4.6. Jedinica za ekstrakciju sastavljena od nosive ploče za filterski lončić (točka 4.2.) i ispusne cijevi koja je preko slavine priključena na tekućinu i vakuum.
- 4.7. Spojni prstenovi za sklapanje grijaće jedinice (točka 4.1.), lončića (točka 4.2.) i valjka (točka 4.3.) i za priključivanje jedinice za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.) i lončića.

5. Postupak

Odvagne se 1 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u lončić (točka 4.2.) (vidjeti napomene pod točkama 8.1., 8.2. i 8.3.) te se doda 1 g sredstva za filtriranje (točka 3.3.).

▼B

Najprije se sklopi grijaća jedinica (točka 4.1.) i filtarski lončić (točka 4.2.), a zatim se valjak (točka 4.3.) priključi na lončić. U sklopljeni valjak i lončić nalije se 150 ml vrele sumporne kiseline (točka 3.1) i prema potrebi nekoliko kapi sredstva protiv pjenjenja (točka 3.2.).

Tekućina se zagrijava do ključanja u 5 ± 2 minuta i ostavi snažno ključati točno 30 minuta.

Otvori se slavina na ispusnoj cijevi (točka 4.1.), sumporna kiselina se pod vakuumom filtrira kroz filtarski lončić i ostatak se tripot uzastopno ispere s po 30 ml vrele vode, pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suhog.

Ispusna se slavina zatvori, u sklop valjak-lončić nalije se 150 ml vrele otopine kalijevog hidroksida (točka 3.7.) i doda se nekoliko kapi sredstva protiv pjenjenja (točka 3.2). Tekućina se zagrijava do točke ključanja u 5 ± 2 minuta i ostavi snažno ključati točno 30 minuta. Filtrira se i ponovi postupak ispiranja kako je navedeno za postupak sa sumpornom kiselinom.

Nakon konačnog ispiranja i sušenja, odspoji se lončić sa sadržajem i priključi na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.). Ostatak u lončiću se pod vakuumom tripot uzastopno ispere s po 25 ml acetona (točka 3.4.), pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suhog.

Lončić se osuši u sušilu na 130 °C do konstantne mase. Nakon svakog sušenja ohladi se u eksikatoru i brzo izvaže. Lončić se postavi u mufolnu peć i žari najmanje 30 minuta na 475 – 500 °C do konstantne mase (gubitak mase između dvaju uzastopnih vaganja ne smije prijeći 2 mg).

Nakon svakoga grijanja i prije vaganja, lončić se prvo ohladi u peći, a zatim u eksikatoru.

Izvodi se slijepa proba bez uzorka. Gubitak mase pri žarenju ne smije prijeći 4 mg.

6. Izračun rezultata

Udio sirovih vlakana, iskazan kao postotni udio uzorka, izračunava se sljedećom formulom:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

pri čemu je:

- m = masa uzorka u gramima,
- m_0 = gubitak mase nakon žarenja tijekom postupka određivanja, u gramima,
- m_1 = gubitak mase nakon žarenja tijekom slijepe probe, u gramima.

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 0,6 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih vlakana manje od 10 %,
- 6 % veće vrijednosti za udio sirovih vlakana jednak ili veći od 10 %.

8. Napomene

- 8.1. Hranu za životinje koja sadrži više od 10 % sirovih masti prije analize treba odmastiti laganim petrolejem (točka 3.5.). Filtarski se lončić (točka 4.2.) sa sadržajem spoji na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6), a ostatak se pod vakuumom tripot ispere s po 30 ml laganog petroleja, pri

▼B

čemu treba provjeriti da je ostatak suh. Nakon što se lončić sa sadržajem priključi na grijaću jedinicu (točka 4.1.), nastavi se u skladu s točkom 5.

- 8.2. Hranu za životinje koja sadrži masti koje se ne mogu direktno ekstrahirati laganim petrolejem (točka 3.5.), treba odmastiti u skladu s točkom 8.1. i ponovo odmastiti nakon ključanja s kiselinom. Nakon ključanja s kiselinom i naknadnog ispiranja, lončić sa sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.) i tripot ispere s po 30 ml acetona i tripot s po 30 ml laganog petroleja. Filtrira se pod vakuumom do suhog i nastavi u skladu s točkom 5, pri čemu se postupak započne dodavanjem kalijeveg hidroksida.
- 8.3. Ako hrana za životinje sadrži više od 5 % karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, lončić (točka 4.2.) s izvaganim uzorkom se priključi na grijaću jedinicu (točka 4.1.). Uzorak se tripot ispere s po 30 ml klorovodične kiseline (točka 3.6). Nakon svakog dodavanja, uzorak se ostavi približno jednu minutu prije filtriranja. Ispere se s 30 ml vode i nastavi u skladu s točkom 5.
- 8.4. Ako se koristi uređaj u obliku stalka (nekoliko lončića priključenih na istu grijaću jedinicu), u istoj se seriji ne smiju izvesti dva postupka određivanja na istom uzorku za analizu.
- 8.5. Ako se kisele i bazične otopine nakon ključanja teško filtriraju, propuše se stlačeni zrak kroz ispusnu cijev grijaće jedinice i nastavi s filtriranjem.
- 8.6. Temperatura žarenja ne smije prijeći 500 °C kako bi se produljio vijek trajanja staklenih filtarskih lončića. Pri tome se mora voditi računa kako bi se spriječio pretjerani toplinski šok između ciklusa grijanja i hlađenja.

J. ODREĐIVANJE ŠEĆERA

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje količine reducirajućih šećera i ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza ili, ovisno o slučaju, kao saharoza, s faktorom konverzije 0,95. Primjenjuje se za krmne smjese. Za drugu hranu za životinje primjenjuju se posebne metode. Prema potrebi, laktoza se određuje odvojeno i uzima u obzir pri izračunu rezultata.

2. Načelo

Šećeri se ekstrahiraju razrijeđenim etanolom; otopina se izbistri otopinama Carrez I i Carrez II. Nakon uklanjanja etanola određuju se količine prije i nakon inverzije Luff-Schoorlovom metodom.

3. Reagensi

- 3.1. Otopina etanola 40 % (v/v) gustoće: 0,948 g/ml na 20 °C, neutralizirana prema fenolftaleinu.
- 3.2. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.3. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijeveg ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.4. Metiloranž, otopina 0,1 % (m/v).
- 3.5. Klorovodična kiselina, 4 mol/l.
- 3.6. Klorovodična kiselina, 0,1 mol/l.

▼B

- 3.7. Otopina natrijevog hidroksida, 0,1 mol/l.
- 3.8. Luff-Schoorlov reagens:
- Uz oprezno miješanje, u otopinu natrijevog karbonata (točka 3.8.3.) ulije se otopina limunske kiseline (točka 3.8.2.). Doda se otopina bakrovog sulfata (točka 3.8.1.) i dopuni vodom do 1 litre. Ostavi se preko noći i filtrira.
- Provjeri se koncentracija tako dobivenog reagensa (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), vidjeti zadnji stavak točke 5.4. pH vrijednost otopine je približno 9,4.
- 3.8.1. Otopina bakrovog sulfata: u 100 ml vode otopi se 25 g bakrovog sulfata ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) koji ne sadrži željezo.
- 3.8.2. Otopina limunske kiseline: u 50 ml vode otopi se 50 g limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- 3.8.3. Otopina natrijevog karbonata: u približno 300 ml tople vode otopi se 143,8 g bezvodnog natrijevog karbonata. Ostavi se da se ohladi.
- 3.9. Otopina natrijevog tiosulfata, 0,1 mol/l.
- 3.10. Otopina škroba: u litru ključajuće vode doda se suspenzija 5 g topljivog škroba u 30 ml vode. Ostavi se 3 minute da vrije, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.
- 3.11. Sumporna kiselina, 3 mol/l.
- 3.12. Kalijev jodid, otopina 30 % (m/v).
- 3.13. Plovućac u zrnu prokuhan u klorovodičnoj kiselini, ispran vodom i osušen.
- 3.14. 3-metilbutan-1-ol.

4. Oprema

Mješalica (rotacijska): približno 35 do 40 okr./min.

5. Postupak**5.1. Ekstrakcija uzorka**

Odvagne se 2,5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 250 ml. Doda se 200 ml etanola (točka 3.1.) i 1 sat miješa u mješalici. Doda se 5 ml otopine Carrez I (točka 3.2.) i miješa približno 30 sekunda. Doda se 5 ml otopine Carrez II (točka 3.3.) i ponovo miješa 1 minutu. Dopuni se do oznake etanolom (točka 3.1), homogenizira i filtrira. Uzme se 200 ml filtrata i otpari približno polovica kako bi se uklonila većina etanola. Toplom vodom se ostatak nakon otparivanja kvantitativno prenese u graduiranu tikvicu obujma 200 ml, ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizira i prema potrebi filtrira. Ta se otopina koristi za određivanje količine reducirajućih šećera, a nakon inverzije, ukupnih šećera.

5.2. Određivanje reducirajućih šećera

Pipetom se prenese najviše 25 ml otopine koja sadrži manje od 60 mg reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza. Prema potrebi se dopuni destiliranom vodom do 25 ml i Luff-Schoorlovom metodom odredi udio reducirajućih šećera. Rezultat se iskazuje kao postotak glukoze sadržan u uzorku za analizu.

5.3. Određivanje ukupnih šećera nakon inverzije

Pipetom se prenese 50 ml otopine u graduiranu tikvicu obujma 100 ml. Doda se nekoliko kapi otopine metiloranža (točka 3.4.), zatim se oprezno, uz stalno miješanje, dodaje klorovodična kiselina (točka 3.5.) sve dok tekućina na postane potpuno crvena. Doda se 15 ml klorovodične kiseline (točka 3.6.), tikvica se uroni u vodenu kupelj koja snažno ključa i u njoj ostavi 30 minuta. Brzo se ohladi na približno 20 °C i doda 15 ml otopine natrijevog hidroksida (točka 3.7.). Dopuni se vodom do 100 ml i homogenizira. Pipetom se prenese najviše 25 ml otopine koja

▼B

sadrži manje od 60 mg reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza. Prema potrebi se dopuni destiliranom vodom do 25 ml i Luff-Schoorlovom metodom odredi udio reducirajućih šećera. Rezultat se iskazuje kao postotni udio glukoze ili, prema potrebi, saharoze što se dobije množenjem s faktorom 0,95.

5.4. *Titracija prema Luff-Schoorlovoj metodi*

Pipetom se prenese 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa (točka 3.8.) u Erlenmeyerovu tikvicu obujma 300 ml; doda se točno 25 ml izbistrene otopine šećera. Doda se 2 zrnca plovućca (točka 3.13.), zagrijava nad otvorenim plamenom srednje jačine, uz ručno miješanje, tako da tekućina proključa za približno dvije minute. Erlenmeyerova se tikvica odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom s otvorom promjera 6 cm, ispod kojeg se upali plamen. Plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice. Na Erlenmeyerovu se tikvicu priključi kondenzator s povratnim protokom. Ostavi se da ključa točno 10 minuta. Odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titrira na sljedeći način:

Doda se 10 ml otopine kalijevog jodida (točka 3.12.) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenjenja) 25 ml sumporne kiseline (točka 3.11.). Titrira se otopinom natrijevog tiosulfata (točka 3.9.) do pojave mutno žute boje, doda se indikator škroba (točka 3.10.) i dovrši titracija.

Jednaka se titracija izvede bez ključanja na točno izmjerenoj smjesi 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa (točka 3.8.) i 25 ml vode, nakon dodavanja 10 ml otopine kalijevog jodida (točka 3.12.) i 25 ml sumporne kiseline (točka 3.11.).

6. **Izračun rezultata**

Iz tablice se odredi količina glukoze u mg koja odgovara razlici između vrijednosti obje titracije, iskazanih u mg natrijevog tiosulfata 0,1 mol/l. Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. **Posebni postupci**

- 7.1. Kod hrane za životinje koja je bogata melasom i drugih vrsta hrane za životinje koje nisu posebno homogene, odvagne se 20 g uzorka i prenese s 500 ml vode u građiranu tikvicu obujma 1 l. Miješa se 1 sat u rotacijskoj mješalici. Otopina se izbistri reagensima Carrez I (točka 3.2.) i II (točka 3.3.), u skladu s točkom 5.1., ovaj put s četverostrukom količinom svakog reagensa. Tikvica se dopuni do oznake etanolom 80 % (v/v).

Homogenizira se i filtrira. Etanol se ukloni u skladu s točkom 5.1. Ako nema dekstriniranog škroba, dopuni se destiliranom vodom do oznake.

- 7.2. Kod melasa i sirovina za hranu za životinje bogatih šećerom i gotovo potpuno bez škroba (rogač, sušeni rezanci šećerne repe itd.), odvagne se 5 g i prenese u građiranu tikvicu obujma 250 ml, doda se 200 ml destilirane vode i miješa u rotacijskoj mješalici jedan sat ili prema potrebi više. Otopina se izbistri reagensima Carrez I (točka 3.2.) i II (točka 3.3.), u skladu s točkom 5.1. Dopuni se hladnom vodom do oznake, homogenizira i filtrira. Za određivanje količine ukupnih šećera nastavi se u skladu s točkom 5.3.

8. **Napomene**

- 8.1. Za sprečavanje pjenjenja preporučuje se prije ključanja s Luff-Schoorlovim reagensom dodati (bez obzira na obujam) približno 1 ml 3-metilbutan-1-ola (točka 3.14.).

▼B

- 8.2. Razlika između udjela ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza, i udjela reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza, pomnoženo s 0,95, daje postotni udio saharoze.
- 8.3. Za određivanje udjela reducirajućih šećera, osim laktoze, mogu se koristiti dvije metode:
- 8.3.1. Za približan izračun, udio se laktoze, određen drugom analitičkom metodom, pomnoži s 0,675, a dobiveni rezultat oduzme od udjela reducirajućih šećera.
- 8.3.2. Za točan izračun reducirajućih šećera, osim laktoze, mora se koristiti isti uzorak za dva konačna postupka određivanja. Jedna se analiza izvodi na dijelu otopine dobivene postupkom iz točke 5.1., druga na dijelu otopine dobivene pri određivanju laktoze metodom utvrđenom za tu svrhu (nakon fermentiranja drugih vrsta šećera i bistrenja).

U oba se slučaja količina šećera određuje Luff-Schoorlovom metodom i izračunava u mg glukoze. Jedna se vrijednost oduzme od druge i razlika iskazuje kao postotni udio uzorka.

Primjer:

Dva korištena volumena odgovaraju, za svaki postupak određivanja, uzorku od 250 mg.

U prvom se slučaju potroši 17 ml otopine natrijevog tiosulfata 0,1 mol/l, što odgovara 44,2 mg glukoze; u drugom se potroši 11 ml, što odgovara 27,6 mg glukoze.

Razlika je 16,6 mg glukoze.

Udio reducirajućih šećera (osim laktoze), izračunan kao glukoza, dakle iznosi:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64\%$$

Tablica vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, dvije minute grijanja, 10 minuta ključanja

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertirani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼B**K. ODREĐIVANJE LAKTOZE****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine laktoze u hrani za životinje koja sadrži više od 0,5 % laktoze.

2. Načelo

Šećeri se otope u vodi. Otopina se fermentira kvascem vrste *Saccharomyces cerevisiae* koji ne mijenja laktozu. Nakon bistrenja i filtriranja, udio laktoze u filtratu određuje se Luff-Schoorlovom metodom.

3. Reagensi

3.1. Suspenzija kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*: otopi se 25 g svježeg kvasca u 100 ml vode. Suspenzija se uz držanje u hladnjaku može koristiti najviše jedan tjedan.

3.2. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijevog ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Luff-Schoorlov reagens:

Uz oprezno miješanje, u otopinu natrijevog karbonata (točka 3.4.3.) ulije se otopina limunske kiseline (točka 3.4.2.). Doda se otopina bakrovog sulfata (točka 3.4.1.) i dopuni vodom do 1 litre. Ostavi se preko noći i filtrira. Provjeri se koncentracija tako dobivenog reagensa (Cu 0,05 mol/l, Na_2CO_3 1 mol/l). pH vrijednost otopine je približno 9,4.

3.4.1. Otopina bakrovog sulfata: u 100 ml vode otopi se 25 g bakrovog sulfata $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ koji ne sadrži željezo.

3.4.2. Otopina limunske kiseline: u 50 ml vode otopi se 50 g limunske kiseline $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.4.3. Otopina natrijevog karbonata: u približno 300 ml tople vode otopi se 143,8 g bezvodnog natrijevog karbonata. Ostavi se da se ohladi.

3.5. Plovućac u zrnju, prokuhan u klorovodičnoj kiselini, ispran i osušen.

3.6. Kalijev jodid, otopina 30 % (m/v).

3.7. Sumporna kiselina, 3 mol/l.

3.8. Otopina natrijevog tiosulfata, 0,1 mol/l.

3.9. Otopina škroba: u litru vrele vode doda se suspenzija 5 g topljivog škroba u 30 ml vode. Ostavi se da vrije 3 minute, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

4. Oprema

Vodena kupelj s termostatom postavljenim na 38 – 40 °C

5. Postupak

Odvagne se 1 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml. Doda se 25 – 30 ml vode. Tikvica se potopi u ključajuću vodenu kupelj i u njoj ostavi 30 minuta, zatim se ohladi na približno 35 °C. Doda se 5 ml suspenzije kvasca (točka 3.1.) i homogenizira. Tikvica se ostavi 2 sata u vodenoj kupelji na temperaturi 38 – 40 °C. Ohladi se na približno 20 °C.

Doda se 2,5 ml otopine Carrez I (točka 3.2.) i miješa 30 sekundi, zatim 2,5 ml otopine Carrez II (točka 3.3.) i ponovo miješa 30 sekundi. Dopuni se vodom do 100 ml, promiješa i filtrira. Dio filtrata ne veći

▼B

od 25 ml, koji poželjno sadrži 40 do 80 mg laktoze, pipetom se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu obujma 300 ml. Prema potrebi se dopuni vodom do 25 ml.

Na isti se način izvodi slijepa proba s 5 ml suspenzije kvasca (točka 3.1.). Udio laktoze se određuje Luff-Schoorlovom metodom na sljedeći način: doda se točno 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa (točka 3.4.) i 2 zrna plovuća (točka 3.5.). Uz ručno miješanje zagrijava se iznad otvorenog plamena srednje jakosti tako da tekućina proključa za približno dvije minute. Erlenmeyerova se tikvica odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom s otvorom promjera 6 cm, ispod kojeg se upali plamen. Plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice. Na Erlenmeyerovu se tikvicu priključi kondenzator s povratnim protokom. Ostavi se da vrije točno 10 minuta. Odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titrira na sljedeći način:

Doda se 10 ml otopine kalijevog jodida (točka 3.6.) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenjenja) 25 ml sumporne kiseline (točka 3.7.). Titrira se otopinom natrijevog tiosulfata (točka 3.8.) do pojave mutno žute boje, doda se indikator škroba (točka 3.9.) i dovrši titracija.

Jednaka se titracija izvede bez ključanja na točno izmjerenoj smjesi 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa (točka 3.4.) i 25 ml vode, nakon dodavanja 10 ml otopine kalijevog jodida (točka 3.6.) i 25 ml sumporne kiseline (točka 3.7.).

6. Izračun rezultata

Iz tablice se odredi količina laktoze u mg koja odgovara razlici između vrijednosti dviju titracija, iskazanih u ml natrijevog tiosulfata 0,1 mol/l.

Rezultat se iskazuje kao postotak udjela bezvodne laktoze u uzorku.

7. Napomena

Za proizvode koji sadrže više od 40 % fermentiranog šećera koristi se više od 5 ml suspenzije kvasca (točka 3.1.).

Tablica vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa

ml Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l, dvije minute grijanja, 10 minuta ključanja

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertirani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

▼B**L. ODREĐIVANJE ŠKROBA****POLARIMETRIJSKA METODA****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine škroba i visokomolekularnih produkata razgradnje škroba u hrani za životinje, za provjeru usklađenosti s deklariranom energetske vrijednosti (odredbe iz Priloga VII.) i Direktivom Vijeća 96/25/EZ ⁽¹⁾.

2. Načelo

Metoda obuhvaća dva postupka određivanja. U prvom se postupku uzorak obradi razrijeđenom klorovodičnom kiselinom. Nakon bistrenja i filtriranja, polarimetrijom se izmjeri optička rotacija otopine.

U drugom se postupku uzorak ekstrahira s 40 %-tnim etanolom. Nakon zakiseljavanja filtrata klorovodičnom kiselinom, bistrenja i filtriranja, izmjeri se optička rotacija na isti način kao u prvom postupku određivanja.

Razlika između dvaju mjerenja, pomnožena s poznatim faktorom, daje udio škroba u uzorku.

3. Reagensi

3.1. Klorovodična kiselina, otopina 25 % (m/m), gustoća: 1,126 g/ml.

3.2. Klorovodična kiselina, otopina 1,13 % (m/m).

Koncentracija se mora provjeriti titracijom s otopinom natrijevog hidroksida 0,1 mol/l u prisutnosti metil crvenila 0,1 % (m/v) u etanolu 94 % (v/v). Za neutralizaciju 10 ml potrebno je 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijevog ferocijanida $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.5. Etanol, otopina 40 % (v/v), gustoća: 0,948 g/ml na 20 °C.

4. Oprema

4.1. Erlenmeyerova tikvica obujma 250 ml sa standardnim brušenim vratom i povratnim hladilom.

4.2. Polarimetar ili saharimetar.

5. Postupak**5.1. Priprema uzorka**

Uzorak se usitni tako da sve čestice mogu proći kroz sito s okruglim oćicama promjera 0,5 mm.

5.2. Određivanje ukupne optičke rotacije (P ili S) (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 7.1.)

Odvagane se 2,5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u građiranu tikvicu obujma 100 ml. Doda se 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.2.), protrese tako da se pokusni uzorak ravnomjerno raspodijeli i doda još 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.2.). Tikvica se potopi u ključajuću vodu kupelj i prve 3 minute snažno i ravnomjerno trese kako bi se spriječilo nastajanje aglomerata. U vodenoj kupelji mora biti

⁽¹⁾ SL L 125, 23.5.1996., str. 35.

▼B

toliko vode da kada se u nju potopi tikvica kupelj ostane na točki ključanja. Tikvica se tijekom tresenja ne smije vaditi iz kupelji. Nakon točno 15 minuta, tikvica se izvadi iz kupelji, doda se 30 ml hladne vode i odmah ohladi na 20 °C.

Doda se 5 ml otopine Carrez I (točka 3.3.) i trese približno 30 sekundi. Zatim se doda 5 ml otopine Carrez II (točka 3.4.) i ponovo trese 30 sekundi. Dopuni se vodom do oznake, promiješa i filtrira. Ako filtrat nije potpuno bistar (što se rijetko događa), ponovi se postupak određivanja uz korištenje veće količine otopina Carrez I i II, na primjer 10 ml.

Polarimetrom ili saharimetrom se izmjeri optička rotacija otopine u epruveti obujma 200 ml.

5.3. *Određivanje optičke rotacije (P' ili S') tvari topljivih u etanolu 40 %*

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg, prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml i doda približno 80 ml etanola (točka 3.5.) (vidjeti napomenu pod točkom 7.2.). Tikvica se ostavi 1 sat na sobnoj temperaturi; u tom se vremenskom razdoblju šest puta snažno protrese kako bi se pokusni uzorak temeljito promiješao s etanolom. Dopuni se etanolom (točka 3.5.) do oznake, promiješa i filtrira.

Pipetom se prenese 50 ml filtrata (što odgovara količini od 2,5 g uzorka) u Erlenmeyerovu tikvicu obujma 250 ml, doda se 2,1 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.) i snažno protrese. Kondenzator s povratnim protokom se priključi na Erlenmeyerovu tikvicu i uroni u ključajuću vodu kupelj. Nakon točno 15 minuta, Erlenmeyerova se tikvica izvadi iz kupelji, a njezin udio prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml, ispere s malo hladne vode i ohladi na 20 °C.

Izbistri se otopinama Carrez I (točka 3.3.) i II (točka 3.4.), dopuni vodom do oznake, promiješa i filtrira, a zatim se izmjeri optička rotacija, kako je navedeno u drugom i trećem stavku točke 5.2.

6. **Izračun rezultata**

Udio škroba (%) izračunava se na sljedeći način:

6.1. *Mjerenje polarimetrom Udio škroba (%)*

$$\text{Continut de amidon (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = ukupna optička rotacija u kutnim stupnjevima

P' = optička rotacija tvari topljivih u etanolu 40 % (v/v) etanolu, u kutnim stupnjevima

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = specifična optička rotacija čistog škroba. Brojčane vrijednosti koje se smatraju uobičajeno prihvaćenima za ovaj faktor su:

+185,9°: rižin škrob;
 +185,7°: krumpirov škrob;
 +184,6°: kukuruzni škrob;
 +182,7°: pšenični škrob;
 +181,5°: ječmeni škrob;
 +181,3°: zobeni škrob;
 +184,0°: druge vrste škroba i škrobnih smjesa u krmnim smjesama.

6.2. *Mjerenje saharimetrom Udio škroba (%)*

$$\text{Continut de amidon (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

▼B

- S = ukupna optička rotacija u stupnjevima saharimetra
 S' = optička rotacija tvari topljivih u 40 %-tnom etanolu (v/v), u stupnjevima saharimetra
 N = masa (g) saharoze u 100 ml vode pri kojoj je optička rotacija 100 saharimetarskih stupnjeva, kada se mjeri upotrebom epruvete od 200 mm
 16,29 g za francuske saharimetre
 26,00 g za njemačke saharimetre
 20,00 g za mješovite saharimetre.
 $[\alpha]_D^{20}$ = specifična optička rotacija čistog škroba (vidjeti 6.1.)

6.3. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 0,4 apsolutne vrijednosti za udio škroba niži od 40 % i 1 % relativne vrijednosti za udio škroba jednak ili veći od 40 %.

7. **Napomene**

7.1. Ako uzorak sadrži više od 6 % karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, oni se prije određivanja ukupne optičke rotacije moraju uništiti obradom s točno potrebnom količinom razrijeđene sumporne kiseline.

7.2. Kod proizvoda s visokim sadržajem laktoze, poput mliječnog seruma u prahu ili obranog mlijeka u prahu, nakon dodavanja 80 ml etanola (točka 3.5.) postupa se na sljedeći način. Na tikvicu se priključi kondenzator s povratnim protokom i tikvica se 30 minuta drži potopljena u vodenoj kupelji na 50 °C. Ostavi se da se ohladi i nastavi s analizom u skladu s točkom 5.3.

7.3. Sljedeće sirovine za hranu za životinje, kada su u hrani za životinje prisutne u znatnoj količini, uzrokuju smetnje pri određivanju udjela škroba polarimetrijskom metodom, što može dovesti do neispravnih rezultata:

— proizvodi od šećerne repe, poput suhih rezanaca šećerne repe, melase šećerne repe, melasiranih rezanaca šećerne repe, vinase šećerne repe, šećera od šećerne repe,

— pulpa citrusa,

— sjemenke lana; pogača od sjemenki lana; sačma od sjemenki lana,

— sjeme uljane repice; pogača uljane repice; sačma uljane repice; ljuske uljane repice,

— sjemenke suncokreta; sačma od sjemenki suncokreta; sačma od djelomično oljuštenih sjemenki suncokreta,

— pogača od kokosa, sačma kokosa,

— pulpa krumpira,

— suhi kvasac,

— proizvodi s visokim udjelom inulina (npr. kriške i brašno od čičoke, lat. *Heliathus tuberosus*),

— čvarci.

M. ODREĐIVANJE SIROVOG PEPELA

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje udjela sirovog pepela u hrani za životinje.

▼B**2. Načelo**

Uzorak se spali na 550 °C; ostatak se izvaže.

3. Reagensi

Amonijev nitrat, 20 %-tna (m/v).

4. Oprema

4.1. Grijaća ploča.

4.2. Električna mufolna peć s termostatom.

4.3. Lončići za spaljivanje od kvarcnog stakla, porculana ili platine, pravokutni (približno 60 × 40 × 25 mm) ili okrugli (promjer: 60 do 75 mm, visina: 20 do 40 mm).

5. Postupak

Odvagne se približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg (2,5 g kod proizvoda koji lako nabubre) i prenese u lončić za spaljivanje koji se prethodno zagrije na 550 °C, ohladi i tarira. Lončić se postavi na grijaću ploču i postupno zagrijava sve dok tvar ne poughljeni. Spali se u skladu s točkom 5.1. ili 5.2.

5.1. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. Ostavi se na toj temperaturi sve do nastanka bijelog, svijetlo sivog ili crvenkastog pepela koji izgleda kao da ne sadrži ugljične čestice. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se da se ohladi i odmah izvaže.

5.2. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. U peći se spaljuje 3 sata. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se da se ohladi i odmah izvaže. Ponovo se 30 minuta spaljuje kako bi se osiguralo da je masa pepela konstantna (gubitak mase između dvaju uzastopnih vaganja ne smije prijeći 1 mg).

6. Izračun rezultata

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. Napomene

7.1. *Tvari koje se teško spaljuju* moraju se izložiti prvom spaljivanju u trajanju od najmanje tri sata, zatim se ohlade i dodaje im se nekoliko kapi 20 %-tne otopine amonijevog nitrata ili vode (oprezno, kako bi se spriječilo raspršivanje pepela ili nastanak gruda). Nakon sušenja u sušilu nastavi se sa spaljivanjem. Postupak se prema potrebi ponavlja, sve do potpunog spaljivanja.

7.2. Kod *tvari koje su otporne na obradu* iz točke 7.1., postupa se na sljedeći način: nakon trosatnog spaljivanja, pepeo se prenese u toplu vodu i filtrira kroz mali filter bez pepela. Filter i njegov udio se spale u istom lončiću. Filtrat se prenese u ohlađen lončić, otpari do suhog, spali i izvaže.

7.3. Kod *ulja i masti*, točno se izvaže 25 g u lončić prikladne veličine. Spaljuje se tako da se tvar zapali vrpcom od filtarnog papira bez pepela. Nakon spaljivanja navlaži se što je moguće manjom količinom vode. Osuši se i spali u skladu s točkom 5.

▼B**N. ODREĐIVANJE PEPELA NETOPLJIVOG U KLOROVODIČNOJ KISELINI****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine mineralnih tvari u hrani za životinje, netopljivih u klorovodičnoj kiselini. Uzimajući u obzir prirodu uzorka mogu se primijeniti dvije metode.

1.1. *Metoda A:* primjenjuje se za organske sirovine za hranu za životinje i većinu krmnih smjesa.

1.2. *Metoda B:* primjenjuje se za mineralne krmne smjese i krmne smjese koje, prema metodi A, sadrže više od 1 % tvari netopljivih u klorovodičnoj kiselini.

2. Načelo

2.1. *Metoda A:* uzorak se spali, pepeo se otopi u vreloj klorovodičnoj kiselini, a netopljivi ostatak se filtrira i izvaže.

2.2. *Metoda B:* uzorak se obradi klorovodičnom kiselinom. Otopina se filtrira, ostatak spali, a tako dobiveni pepeo obradi u skladu s metodom A.

3. Reagensi

3.1. Klorovodična kiselina, 3 mol/l.

3.2. Trikloroctena kiselina, otopina 20 % (m/v).

3.3. Trikloroctena kiselina, otopina 1 % (m/v).

4. Oprema

4.1. Grijača ploča.

4.2. Električna mufolna peć s termostatom.

4.3. Lončići za spaljivanje izrađeni od kvarcnog stakla, porculana ili platine, pravokutni (približno 60 × 40 × 25 mm) ili okrugli (promjer: 60 do 75 mm, visina: 20 do 40 mm).

5. Postupak**5.1. Metoda A**

Uzorak se spali u skladu s metodom za određivanje sirovog pepela. Može se koristiti i pepeo dobiven tijekom navedene analize.

Pepeo se prenese u čašu obujma 250 ml do 400 ml sa 75 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.). Polako se zagrije do ključanja i petnaest minuta ostavi lagano ključati. Topla otopina se filtrira kroz papir za filtriranje bez pepela, ostatak se ispire toplom vodom sve do prestanka kisele reakcije. Filtar s ostatkom i pepelom se osuši u tariranom lončiću za spaljivanje na 550 – 700 °C. Ohladi se u eksikatoru i izvaže.

5.2. Metoda B

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u čašu obujma 250 ml do 400 ml. Doda se 25 ml vode, zatim 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.), promiješa i pričeka da se reakcija umiri. Doda se još 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.). Pričeka se dok potpuno ne prestane ispuštanje plina, zatim se čaša stavi u ključajuću vodenu kupelj i tamo drži 30 minuta ili prema potrebi dulje kako bi se potpuno hidrolizirao sav eventualno prisutan škrob. Udio se filtrira dok je topao kroz

▼B

filtar bez pepela, a filtar se ispere s 50 ml tople vode (vidjeti napomenu pod točkom 7.). Filtar koji sadrži ostatak prenese se u lončić za spaljivanje, osuši i spali na 550 – 700 °C. Pepeo se prenese u čašu obujma 250 ml do 400 ml sa 75 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.); nastavi se kako je opisano u drugom podstavku točke 5.1.

6. **Izračun rezultata**

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara. Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. **Napomena**

Ako pri filtriranju nastupe poteškoće, analiza se ponovi, pri čemu se 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.) zamijeni s 50 ml trikloroctene kiseline 20 % (točka 3.2.), a filtar ispere toplom otopinom trikloroctene kiseline 1 % (točka 3.3.).

O. ODREĐIVANJE KARBONATA

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje količine karbonata u većini hrane za životinje, koji se uobičajeno iskazuju kao kalcijev karbonat.

Međutim, u nekim se slučajevima (na primjer, kod željezovog karbonata) mora primijeniti posebna metoda.

2. **Načelo**

Karbonati se razlažu u klorovodičnoj kiselini; oslobođeni se ugljikov dioksid prikupi u graduiranu epruvetu, a njegov obujam usporedi s obujmom koji se pod istim uvjetima oslobađa iz poznate količine kalcijevog karbonata.

3. **Reagensi**

3.1. Klorovodična kiselina, gustoća 1,10 g/ml.

3.2. Kalcijev karbonat.

3.3. Sumporna kiselina, približno 0,05 mol/l, obojena metil crvenilom.

4. **Oprema**

Scheibler-Dietrichova naprava (vidjeti sliku) ili druga jednakovrijedna naprava.

5. **Postupak**

Ovisno o sadržaju karbonata u uzorku odvagne se dio uzorka, kako je navedeno dalje u tekstu:

— 0,5 g kod proizvoda koji sadrže 50 – 100 % karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat,

— 1 g kod proizvoda koji sadrže 40 – 50 % karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat,

— 2 do 3 g za druge proizvode.

Odvagnuti se dio uzorka prenese u posebnu tikvicu (slika 4.) naprave, opremljenu malom epruvetom od nelomljivog materijala u kojoj se nalazi 10 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.) te se tikvica spoji s napravom. Trosmjerni se pipac (5) okrene tako da je epruveta (1) otvorena prema van. Pomičnom epruvetom (2), napunjenom obojenom sumpornom kiselinom (točka 3.3.) i povezanom s graduiranom epruvetom (1), razina tekućine dovede se do oznake nula. Pipac (5) se okrene tako da se spoje epruvete (1) i (3), zatim se provjeri je li razina na oznaci nula.

Naginjanjem tikvice (4) klorovodična se kiselina (točka 3.1.) polako prelijeva preko uzorka. Tlak se izjednači spuštanjem epruvete (2). Tikvica (4) se trese sve dok potpuno ne prestane oslobađanje ugljikovog dioksida.

Ponovo se uspostavi tlak vraćanjem razine tekućina u epruvetama (1) i (2) na istu razinu. Rezultat se očita nakon *nekoliko minuta* kada se ustali obujam plina.

U istim se uvjetima izvede kontrolni pokus s 0,5 g kalcijevog karbonata (točka 3.2.).

▼ B**6. Izračun rezultata**

Udio karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, izračunava se sljedećom formulom:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

pri čemu je:

X = % (m/m) karbonata u uzorku, iskazanih kao kalcijev karbonat

V = ml oslobođenog CO₂ iz dijela uzorka

V₁ = ml oslobođenog CO₂ iz 0,5 g CaCO₃

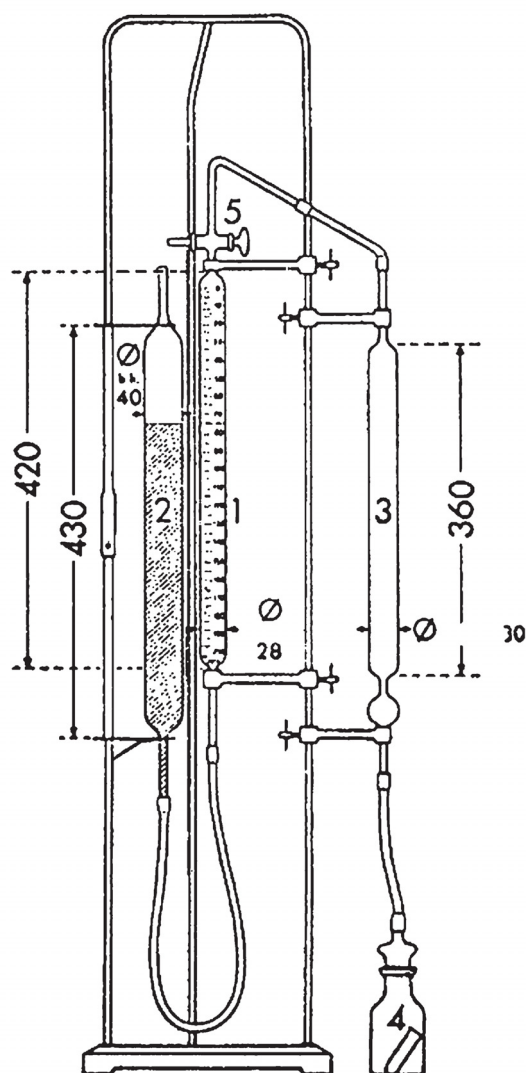
m = masa dijela uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kada je masa dijela uzorka veća od 2 g, prvo se u tikvicu (4) ulije 15 ml destilirane vode i promiješa prije početka pokusa. Za kontrolni se pokus koristi jednaka količina vode.

7.2. Ako se obujam korištene naprave razlikuje od obujma Scheibler-Dietrichove naprave, potrebno je na primjeren način prilagoditi količinu dijelova uzorka i kontrolne tvari i izračun rezultata.

Scheibler-Dietrichova uređaj za određivanje CO₂



Mjereno u mm

▼B**P. ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA****FOTOMETRIJSKA METODA****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje ukupnog udjela fosfora u hrani za životinje. Osobito je primjerena za analizu proizvoda s niskim sadržajem fosfora. U nekim se slučajevima (kod proizvoda bogatih fosforom) može primijeniti i gravimetrijska metoda.

2. Načelo

Uzorak se mineralizira bilo suhim sagorijevanjem (kod organske hrane za životinje) bilo digestijom kiselinom (kod mineralnih mješavina i tekuće hrane za životinje) i prenese u kiselu otopinu. Otopina se obradi molibdovanadatnim reagensom. Optička gustoća tako dobivene žute otopine mjeri se spektrofotometrom na 430 nm.

3. Reagensi

3.1. Kalcijev karbonat.

3.2. Klorovodična kiselina, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (približno 6 mol/l).

3.3. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,38$ do 1,42 g/ml.

3.5. Sumporna kiselina, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.6. Molibdovanadatni reagens: u građiranoj tikvici obujma 1 l pomiješa se 200 ml otopine amonijevog heptamolibdata (točka 3.6.1.), 200 ml otopine amonijevog monovanadata (točka 3.6.2.) i 134 ml dušične kiseline (točka 3.4.). Dopuni se vodom do oznake.

3.6.1. Otopina amonijevog heptamolibdata: u vrućoj se vodi otopi 100 g amonijevog heptamolibdata ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O). Doda se 10 ml amonijaka (gustoća 0,91 g/ml) i dopuni vodom do 1 litre.

3.6.2. Otopina amonijevog monovanadata: u 400 ml vruće vode otopi se 2,35 g amonijevog monovanadata (NH₄VO₃). Uz stalno miješanje polako se dodaje 20 ml razrijeđene dušične kiseline (7 ml HNO₃ (točka 3.4.) + 13 ml H₂O) i dopuni vodom do 1 litre.

3.7. Standardna otopina 1 mg fosfora na ml: u vodi se otopi 4,387 g kalijeveg dihidrogen fosfata (KH₂PO₄). Dopuni se vodom do 1 litre.

4. Oprema

4.1. Lončići za spaljivanje od kvarcnog stakla, porculana ili platine.

4.2. Električna mufolna peć s termostatom postavljenim na 550 °C.

4.3. Kjeldahlova tikvica obujma 250 ml.

4.4. Odmjerne tikvice i precizne pipete.

4.5. Spektrofotometar

4.6. Epruvete promjera približno 16 mm, s brušenim čepovima promjera 14,5 mm, obujma 25 – 30 ml.

5. Postupak**5.1. Priprema otopine**

Uzimajući u obzir prirodu uzorka, otopina se pripravlja u skladu s točkom 5.1.1. ili 5.1.2.

5.1.1. Standardni postupak

Odvagne se 1 g uzorka ili više s preciznošću od 1 mg. Uzorak se prenese u Kjeldahlovu tikvicu, doda se 20 ml sumporne kiseline

▼B

(točka 3.5.) i protrese kako bi se uzorak u potpunosti natopio kiselinom i spriječilo njegovo prijanjanje na stijenke tikvice, zatim se zagrije i ostavi ključati 10 minuta. Ostavi se da se ohladi, doda se 2 ml dušične kiseline (točka 3.4), lagano se zagrije, malo se ohladi, doda se još malo dušične kiseline (točka 3.4.) i ponovo zagrije do ključanja. Postupak se ponavlja sve dok se ne dobije bezbojna otopina. Ohladi se, doda malo vode, tekućina se odlije u građiranu tikvicu obujma 500 ml, a Kjeldahlova tikvica ispere vrućom vodom. Ostavi se da se ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizira i filtrira.

5.1.2. Uzorci koji sadrže organske tvari i ne sadrže kalcijeve i magnezijeve dihidrogen fosfate

Odvagne se i prenese u lončić za spaljivanje 2,5 g uzorka s preciznošću od 1 mg. Doda se 1 g kalcijevog karbonata (točka 3.1.) i miješa dok se tvari u potpunosti ne izmiješaju. Spaljuje se u pećnici pri 550 °C do nastanka bijelog ili sivog pepela (mala količina ugljena ne predstavlja problem). Pepeo se prenese u čašu obujma 250 ml. Doda se 20 ml vode i klorovodične kiseline (točka 3.2.) sve dok ne prestane pjenjenje. Doda se još 10 ml klorovodične kiseline (točka 3.2.). Čaša se stavi u pješčanu kupelj i ostavi da se otpari do suhog, kako bi kvarcni pijesak postao netopljiv. Ostatak se ponovo otopi u 10 ml dušične kiseline (točka 3.3.) i ostavi ključati 5 minuta u pješčanoj kupelji ili na grijaćoj ploči, ali se ne smije potpuno otpariti. Tekućina se odlije u građiranu tikvicu obujma 500 ml, čaša se više puta ispere vrućom vodom. Ostavi se da se ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizira i filtrira.

5.2. Nastanak obojenja i mjerenje optičke gustoće

Razrijedi se alikvot filtrata iz točke 5.1.1. ili 5.1.2. do koncentracije fosfora ne veće od 40 µg/ml. U epruvetu (točka 4.6.) se prenese 10 ml te otopine i doda 10 ml molibdovanadatnog reagensa (točka 3.6.). Homogenizira se i ostavi najmanje 10 minuta na 20 °C. Spektrofotometrom se izmjeri optička gustoća na 430 nm usporedbom s otopinom dobivenom dodavanjem 10 ml molibdovanadatnog reagensa (točka 3.6.) u 10 ml vode.

5.3. Kalibracijska krivulja

Iz standardne otopine (točka 3.7.) pripreme se otopine koje sadrže 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosfora na ml. Uzme se po 10 ml od svake navedene otopine i doda 10 ml molibdovanadatnog reagensa (točka 3.6.). Homogenizira se i ostavi najmanje 10 minuta na 20 °C. Izmjeri se optička gustoća u skladu s točkom 5.2. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće odgovarajućih količina fosfora. Za koncentracije u rasponu od 0 – 40 µg/ml krivulja je linearna.

6. Izračun rezultata

Količina fosfora u pokusnom uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 3 % višeg rezultata, ako je udio fosfora niži od 5 %,

— 0,15 % apsolutne vrijednosti, ako je udio fosfora 5 % ili više.

▼B**Q. ODREĐIVANJE KLORA IZ KLORIDA****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje količine klora u kloridima topljivima u vodi koji se uobičajeno iskazuju kao natrijev klorid. Primjenjuje se za svu hranu za životinje.

2. Načelo

Kloridi se otope u vodi. Ako proizvod sadrži organske tvari, koristi se postupak bistenja. Otopina se lagano zakiseli dušičnom kiselinom, a kloridi istalože u obliku srebrovog klorida, upotrebom otopine srebrovog nitrata. Višak srebrovog nitrata titrira se otopinom amonijevog tiocijanata po Volhardovoj metodi.

3. Reagensi

- 3.1. Otopina amonijevog tiocijanata, 0,1 mol/litra.
- 3.2. Otopina srebrovog nitrata, 0,1 mol/l.
- 3.3. Zasićena otopina amonij-željezovog sulfata $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Dušična kiselina, gustoća: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietileter.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.8. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijeveg ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.9. Aktivni ugljen koji ne sadrži kloride niti ih apsorbira.

4. Oprema

Mješalica (rotacijska): približno 35 do 40 okr./min.

5. Postupak**5.1. Priprema otopine**

Uzimajući u obzir prirodu uzorka, otopina se pripravlja prema točki 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3.

Istodobno se izvodi slijepa proba bez uzorka koji se analizira.

5.1.1. Uzorci bez organskih tvari

Odvagne se najviše 10 g uzorka koji sadrži najviše 3 g klora u obliku klorida s preciznošću od 1 mg. Prenese se u građiranu tikvicu obujma 500 ml s 400 ml vode na približno 20 °C. Miješa se 30 minuta u rotacijskoj mješalici, dopuni do oznake, homogenizira i filtrira.

5.1.2. Uzorci koji sadrže organske tvari, osim proizvoda iz točke 5.1.3.

Odvagne se približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese zajedno s 1 g aktivnog uglja u građiranu tikvicu obujma 500 ml. Doda se 400 ml vode temperature približno 20 °C i 5 ml otopine Carrez I (točka 3.7.), miješa se 30 sekundi i doda 5 ml otopine Carrez II (točka 3.8.). Miješa se 30 minuta u rotacijskoj mješalici, dopuni do oznake, homogenizira i filtrira.

▼B

- 5.1.3. Kuhana hrana za životinje, lanene pogače i brašno, proizvodi bogati lanenim brašnom i drugi proizvodi bogati sluzima ili koloidnim tvarima (na primjer, dekstrinirani škrob)

Otopina se pripravi u skladu s točkom 5.1.2., ali se ne filtrira. Dekantira se (prema potrebi centrifugira), uzme se 100 ml supernatanta i prenese u graduiranu tikvicu obujma 200 ml. Pomiješa se s acetonom (točka 3.6.) i s tim otapalom dopuni do oznake, homogenizira i filtrira.

5.2. *Titracija*

Pipetom se u Erlenmeyerovu tikvicu prenese 25 – 100 ml filtrata (uzimajući u obzir pretpostavljeni udio klora) dobivenog postupkom iz točke 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3. Alikvotni dio ne smije sadržavati više od 150 mg klora (Cl). Prema potrebi se razrijedi vodom na najmanje 50 ml, doda se 5 ml dušične kiseline (točka 3.4), 20 ml zasićene otopine amonij-željezovog sulfata (točka 3.3.) i 2 kapi otopine amonijevog tiocijanata (točka 3.1.), koji se prenese iz birete napunjene do nulte oznake. Biretom se prenese otopina srebrovog nitrata (točka 3.2.) tako da nastane 5 ml viška. Doda se 5 ml dietiletra (točka 3.5.) i dobro protrese tako da se talog zgruša. Višak srebrovog nitrata titrira se otopinom amonijevog tiocijanata (točka 3.1.) sve dok crvenkasto-smeđe obojenje ne potraje 1 minutu.

6. **Izračun rezultata**

Količina klora (X), iskazana kao postotni udio natrijevog klorida, izračunava se sljedećom formulom:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

pri čemu je:

V_1 = ml dodane otopine srebrovog nitrata 0,1 mol/l;

V_2 = ml otopine amonijevog tiocijanata 0,1 mol/l korištene za titraciju;

m = masa uzorka.

Ako se pri slijepoj probi potroši otopina srebrovog nitrata 0,1 mol/l, ta se vrijednost oduzme od obujma ($V_1 - V_2$).

7. **Napomene**

- 7.1 Titracija se može izvesti i potencijometrijskom titracijom.
- 7.2 Proizvodi bogati uljima i mastima prvo se odmaste dietileterom ili laganim petrolejem.
- 7.3 Kod ribljeg brašna, titracija se može izvesti Mohrovom metodom.



PRILOG IV.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU RAZINE DOPUŠTENIH KRMNIH DODATAKA

A. ODREĐIVANJE VITAMINA A

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine vitamina A (retinola) u hrani za životinje i premiksima. Vitamin A uključuje trans-retinil alkohol i njegove cis izomere koji se određuju ovom metodom. Udio vitamina A iskazuje se u međunarodnim jedinicama (IU) na kg. Jedna IU odgovara djelovanju 0,300 µg *trans*-vitamin A alkohola ili 0,344 µg *trans*-vitamin A acetata ili 0,550 µg *trans*-vitamin A palmitata.

Granica kvantifikacije je 2 000 IU vitamina A/kg.

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijevog hidroksida, a vitamin A se ekstrahira laganim petrolejem. Otapalo se ukloni otparivanjem, a ostatak otopi u metanolu i prema potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina A se određuje visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom reverznih faza (RP-HPLC) s UV ili fluorescencijskim detektorom. Odaberu se oni kromatografski parametri koji omogućuju da se *trans*-vitamin A alkohol i njegovi cis izomeri ne razdvoje.

3. Reagensi

3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$.

3.2. Lagani petrolej, raspon vrelišta 40 – 60 °C.

3.3. Metanol.

3.4. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.

3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 7.7.).

3.6. Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).

3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ u glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (za $x = 9$) (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 7.8.).

3.7. Otopina fenoltaleina, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ u etanolu (točka 3.1.).

3.8. 2-propanol.

3.9. Mobilna faza za HPLC: smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. 980 + 20 (v + v). Točan se omjer određuje u skladu s osobinama korištene kolone.

3.10. Dušik, bez kisika.

3.11. *Trans*-vitamin A acetat, posebne čistoće, certificiranog djelovanja, npr. $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$.

3.11.1. Osnovna otopina *trans*-vitamin A acetata: odvagane se 50 mg acetata vitamina A (točka 3.11.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8.) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine iznosi 1 400 IU vitamina A na ml. Točan se udio određuje u skladu s točkom 5.6.3.1.

3.12. *Trans*-vitamin A palmitat, posebne čistoće, certificiranog djelovanja, npr. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$.

▼B

- 3.12.1. Osnovna otopina all-trans-vitamin A palmitata: odvagane se 80 mg palmitata vitamina A (točka 3.12.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu obujma 100 ml. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8.) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 1 400 IU vitamina A na ml. Točan se udio određuje u skladu s točkom 5.6.3.2.

- 3.13. 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 7.5.)

4. Oprema

- 4.1. Rotacijski vakuumski otprivač.
- 4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla.
- 4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, obujma 500 ml, s brušenim vratom.
- 4.2.2. Odmjerne tikvice s čepovima od brušenog stakla, s uskim vratom, obujma 10, 25, 100 i 500 ml.
- 4.2.3. Lijeveci za odjeljivanje, konusni, 1 000 ml, s čepovima od brušenog stakla.
- 4.2.4. Kruškaste tikvice, 250 ml, s čepovima od brušenog stakla.
- 4.3. Allihnov kondenzator, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina.
- 4.4. Nabrani filter papir za odjeljivanje faza, promjera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za ubrizgavanje.
- 4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 μm ili jednakovrijedna (mjerilo učinkovitosti: samo jedan vršak za sve izomere retinola u uvjetima za HPLC).
- 4.5.2. UV ili fluorescencijski detektor s mogućnošću promjene valne duljine.
- 4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kivetama od 10 mm.
- 4.7. Vodena kupelj s magnetnom mješalicom.
- 4.8. Uređaj za ekstrakciju (vidjeti sliku 1.) koja se sastoji od:
- 4.8.1. Staklenog valjka obujma 1 litre s vratom i čepom od brušenog stakla.
- 4.8.2. Uloška od brušenog stakla s bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz središte. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tekućine u valjku može prenijeti u lijevak za odjeljivanje.

5. Postupak

Napomena: Vitamin A je osjetljiv na UV svjetlo i oksidaciju. Svi se postupci izvode bez prisutnosti svjetla (u laboratorijskom posuđu od smeđeg stakla ili u staklenim posudama zaštićenim aluminijskom folijom) i kisika (ispire se dušikom). Tijekom ekstrakcije zrak iznad tekućine zamijeni se dušikom (povremenim popuštanjem čepa izbjegava se previsoki tlak).

5.1. Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine očice 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje topline. Mljevenje se mora izvršiti neposredno prije vaganja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina A.

▼B**5.2. Saponifikacija**

Ovisno o sadržaju vitamina A, odvagne se 2 – 25 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u tikvicu s ravnim dnom ili koničnu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.1.). Uz stalno vrtloženje, jedno za drugim dodaje se 130 ml etanola (točka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (točka 3.13.), 2 ml otopine natrijevog askorbata (točka 3.5.) i 2 ml otopine natrijevog sulfida (točka 3.6.). Na tikvicu se priključi kondenzator (točka 4.3.) i tikvica potopi u vodenu kupelj s magnetnom mješalicom (točka 4.7.). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi uz refluks. Zatim se kroz kondenzator doda 25 ml otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4.) i ostavi uz refluks (točka 4.3.) sljedećih 25 minuta, uz miješanje pod laganom strujom dušika. Zatim se kondenzator ispere s približno 20 ml vode, a udio tikvice ohladi na sobnu temperaturu.

5.3. Ekstrakcija

Otopina za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odjeljivanje obujma 1 000 ml (točka 4.2.3.) ili u napravu za ekstrakciju (točka 4.8.), tako što se ispere s ukupno 250 ml vode. Zatim se tikvica za saponifikaciju ispere s 25 ml etanola (točka 3.1.) i 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.), a isprane tekućine prenesu u lijevak za odjeljivanje ili uređaj za ekstrakciju. Omjer vode i etanola u pomiješanim otopinama mora biti približno 2:1. Snažno se trese 2 minute i zatim ostavi 2 minute da se slegne.

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3.)

Kad se slojevi razdvoje (vidjeti napomenu pod točkom pod točkom 7.3.), sloj laganog petroleja prenese se u drugi lijevak za odjeljivanje (točka 4.2.3.). Ekstrakcija se ponovi dvaput sa 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.) i dvaput s 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.).

Pomiješani se ekstrakti u lijevku za odjeljivanje dvaput isperu sa 100 ml vode, uz lagano vrtloženje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano protresivanje s dodatnim obrocima od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju otopine fenoltaleina (točka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani se ekstrakt filtrira kroz suhi nabrani filtar za odjeljivanje faza (točka 4.4) u graduiranu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odjeljivanje i filtar se isperu s 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.), dopuni se laganim petrolejem do oznake (točka 3.2.) i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje (vidjeti napomenu pod točkom 7.3.), čep staklenog valjka (točka 4.8.1.) se zamijeni uloškom od brušenog stakla (točka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi se odmah iznad razine veznog sklopa. Tlakom koji tvori dušik u bočnoj ručici, gornji se sloj laganog petroleja prenese u lijevak za odjeljivanje obujma 1 000 ml (točka 4.2.3.). U stakleni se valjak doda 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.), začepi i dobro protrese. Pričeka se do razdvajanja slojeva, a gornji se sloj prenese u lijevak za odjeljivanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.), zatim dvaput s po 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.), a slojevi laganog petroleja dodaju u lijevak za odjeljivanje.

Pomiješani se ekstrakti laganog petroleja isperu, u skladu s točkom 5.3.1., a zatim se nastavi u skladu s navedenom točkom.

5.4. Priprema otopine uzorka za HPLC

Alikvotni dio otopine laganog petroleja (iz točke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu obujma 250 ml (točka 4.2.4.). Otapalo se otpari skoro do suhog u rotacijskom otparivaču (točka 4.1.) pri sniženom tlaku i temperaturi kupelji do 40 °C. Dovođenjem dušika uspostavi se

▼B

atmosferski tlak (točka 3.10.), a tikvica se izvadi iz rotacijskog otparivača. Preostalo se otapalo otpari u struji dušika (točka 3.10.), a ostatak odmah otpari u poznatom volumenu (10 – 100 ml) metanola (točka 3.3.) (koncentracija vitamina A mora biti u rasponu od 5 do 30 IU/ml).

5.5. *Određivanje HPLC-om*

Vitamin A se razdvaja na koloni C₁₈ s reverznim fazama (točka 4.5.1.), koncentracija se izmjeri UV detektorom (325 nm) ili fluorescencijskim detektorom (ekscitacija: 325 nm, emisija: 475 nm) (točka 4.5.2.).

Ubrizga se alikvotni dio (npr. 20 µl) otopine metanola dobivene u točki 5.4. i eluira mobilnom fazom (točka 3.9.). Izračuna se srednja vrijednost visine (površine) vršaka za više ubrizgavanja iste otopine uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) vršaka za više ubrizgavanja kalibracijskih otopina (točka 5.6.2.).

Uvjeti za HPLC

Sljedeći uvjeti predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.5.1.):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili jednakovrijedna
Mobilna faza (točka 3.9.):	Smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. 980 + 20 (v + v)
Brzina protoka:	1 – 2 ml/min
Detektor (točka 4.5.2.):	UV detektor (325 nm) ili fluorescencijski detektor (ekscitacija: 325 nm/emisija: 475 nm)

5.6. *Kalibracija*

5.6.1. Priprema radnih standardnih otopina

Pipetom se prenese 20 ml osnovne otopine acetata vitamina A (točka 3.11.1.) ili 20 ml osnovne otopine palmitata vitamina A (točka 3.12.1.) u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.1.) i hidrolizira u skladu s točkom 5.2., ali bez dodatka BHT-a. Zatim se ekstrahira s laganim petrolejem (točka 3.2.) u skladu s točkom 5.3. i dopuni laganim petrolejem (točka 3.2.) do 500 ml. U rotacijskom se otparivaču (vidjeti 5.4.) otpari 100 ml ovog ekstrakta gotovo do suhog, strujom dušika (točka 3.10.) ukloni preostalo otapalo, a ostatak ponovno otpari u 10,0 ml metanola (točka 3.3.). Nominalna koncentracija ove otopine je 560 IU vitamina A na ml. Točan udio se određuje u skladu s točkom 5.6.3.3. Radna standardna otopina mora se pripremiti svježa prije upotrebe.

Pipetom se prenese 2,0 ml ove radne standardne otopine u graduiranu tikvicu obujma 20 ml, dopuni metanolom (točka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalna koncentracija takve **razrijeđene** radne standardne otopine iznosi 56 IU vitamina A na ml.

5.6.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje

Prenese se 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml **razrijeđene** radne standardne otopine u seriju graduiranih tikvica obujma 20 ml, dopuni metanolom (točka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih otopina iznose 2, 8, 5, 6, 14,0 i 28,0 IU vitamina A na ml.

Više se puta ubrizga 20 µl svake kalibracijske otopine i odrede srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) vršaka nacrtava kalibracijska krivulja uzimajući u obzir rezultate UV kontrole (točka 5.6.3.3.).

▼B**5.6.3. UV standardizacija standardnih otopina****5.6.3.1. Osnovna otopina acetata vitamina A**

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovne otopine acetata vitamina A (točka 3.11.1.) u graduiranu tikvicu obujma 50 ml (točka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ove razrijeđene otopine acetata vitamina A u graduiranu tikvicu obujma 25 ml i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmjeri se UV spektar ove otopine prema 2-propanolu (točka 3.8.) u spektrofotometru (točka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Izračun udjela vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ za acetat vitamina A = 1 530 na 326 nm u 2-propanolu)

5.6.3.2. Osnovna otopina palmitata vitamina A

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovne otopine palmitata vitamina A (točka 3.12.1.) u graduiranu tikvicu obujma 50 ml (točka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ove razrijeđene otopine palmitata vitamina A u graduiranu tikvicu obujma 25 ml i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmjeri se UV spektar ove otopine prema 2-propanolu (točka 3.8.) u spektrofotometru (točka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Izračun udjela vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ za palmitat vitamina A = 957 na 326 nm u 2-propanolu)

5.6.3.3. Radna standardna otopina vitamina A

Pipetom se prenese 3,0 ml **nerazrijeđene** radne standardne otopine vitamina A, pripravljene u skladu s točkom 5.6.1., u graduiranu tikvicu obujma 50 ml (točka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Pipetom se prenese 5,0 ml ove otopine u graduiranu tikvicu obujma 25 ml i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmjeri se UV spektar ove otopine prema 2-propanolu (točka 3.8.) u spektrofotometru (točka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Izračun udjela vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ za vitamin A alkohol = 1 821 na 325 nm u 2-propanolu)

6. Izračun rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) vršaka vitamina A iz otopine uzorka, određuje se koncentracija otopine uzorka u IU/ml iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.2.).

▼B

Udio vitamina A (w) u uzorku, iskazan u IU/kg, izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} [\text{IU/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija vitamina A (točka 5.4.) u otopini uzorka, iskazana u IU/ml

V₁ = obujam otopine uzorka (točka 5.4.) u ml

V₂ = obujam alikvota korištenog u točki 5.4., u ml

m = masa pokusnog uzorka u gramima

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina A može biti korisno pomiješati ekstrakte laganog petroleja iz dviju šarži za saponifikaciju (izvagana količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za određivanje HPLC-om.

7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (točka 3.1.) za razbijanje emulzije.

7.4. Kod ulja iz jetre bakalara i drugih čistih masti vrijeme trajanja saponifikacije treba produžiti na 45 – 60 minuta.

7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrokinon.

7.6. Izomere retinola moguće je razdvojiti uobičajenom faznom kolonom. U tom slučaju, za izračune treba zbrojiti visine (površine) vršaka svih cis i trans izomera.

7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Pri analizi vitamina A u nadomjescima mlijeka treba paziti na sljedeće:

— kod saponifikacije (točka 5.2.): zbog količine masti u uzorku možda će trebati veća količina otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4.),

— kod ekstrakcije (točka 5.3.): zbog prisutnosti emulzija možda će trebati prilagoditi omjer voda/etanol 2:1.

Za provjeru pouzdanosti rezultata dobivenih korištenom analitičkom metodom na ovoj specifičnoj matrici (nadomjestak mlijeka) treba na dodatnom pokusnom uzorku izvesti test iskorištenja. Ako je iskorištenje manje od 80 %, rezultat analize treba korigirati za iskorištenje.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 15 % u odnosu na najviši rezultat.

▼B9. **Rezultati međulaboratorijske studije ⁽¹⁾**

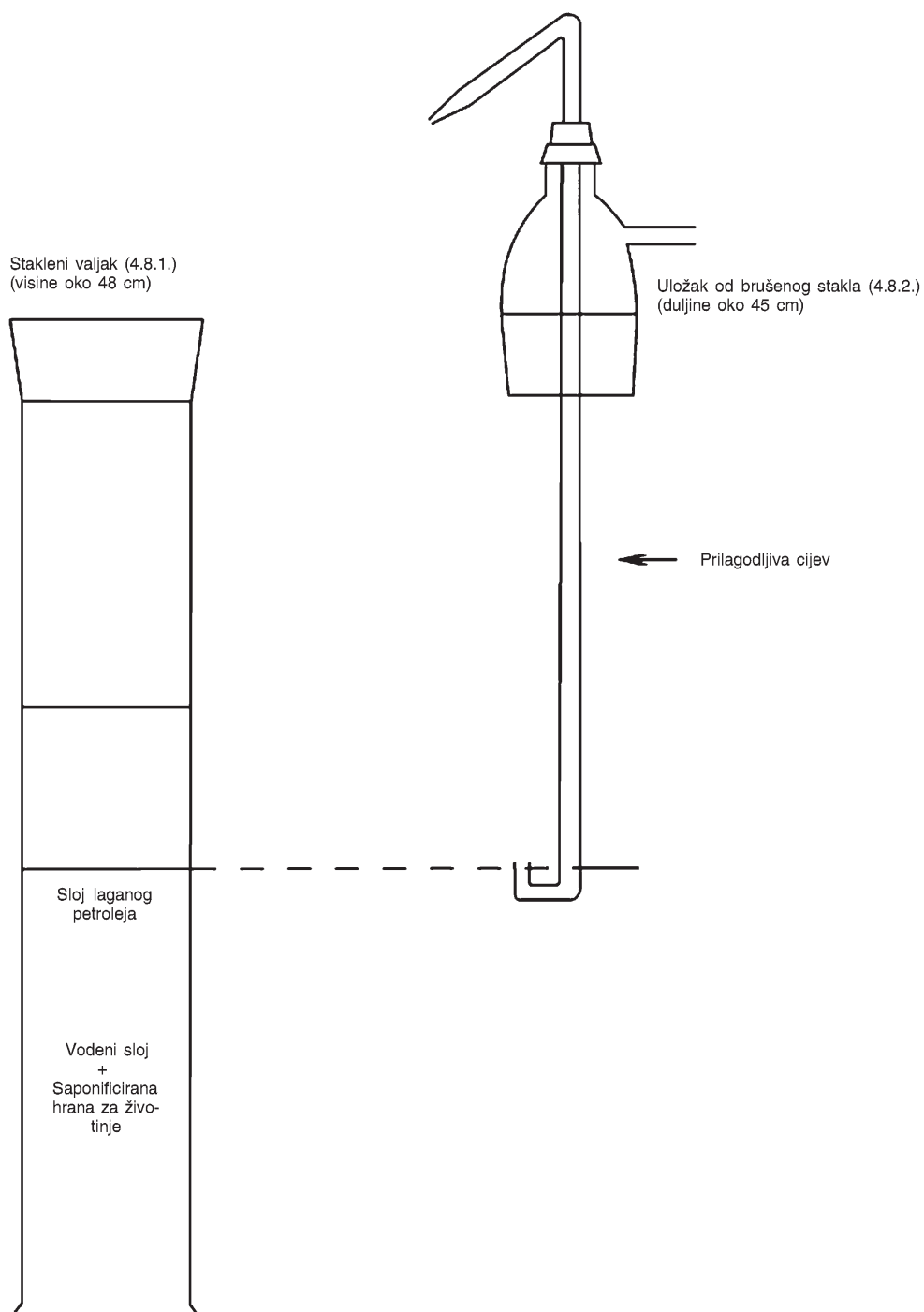
	Premiks	Gotove smjese hrane za stoku	Mineralni koncentrat	Proteinski koncentrat	Hrana za odojke
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
srednja vrijednost [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
S_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = broj laboratorija
 n = broj pojedinačnih vrijednosti
 s_r = standardna devijacija ponovljivosti
 S_R = standardna devijacija obnovljivosti
 r = ponovljivost
 R = obnovljivost
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

⁽¹⁾ Studiju je provela radna skupina za stočnu hranu pri Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



▼B**B. ODREĐIVANJE VITAMINA E****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine vitamina E u hrani za životinje i premiksima. Udio vitamina E iskazuje se u mg DL- α -tokoferol acetata na kg. Količina od 1 mg DL- α -tokoferol acetata odgovara količini od 0,91 mg DL- α -tokoferola (vitamina E).

Granica kvantifikacije je 2 mg vitamina E/kg. Ova se granica kvantifikacije može dosegnuti samo fluorescencijskim detektorom. Granica kvantifikacije za UV detektor iznosi 10 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijeveg hidroksida, a vitamin E se ekstrahira laganim petrolejem. Otapalo se ukloni otparivanjem, a ostatak otopi u metanolu i prema potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina E određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti reverznih faza (RP-HPLC) i UV ili fluorescencijskim detektorom.

3. Reagensi

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Lagani petrolej, raspon vrelišta 40 – 60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Otopina kalijeveg hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (vidjeti napomenu pod točkom 7.7.).
- 3.6. Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ u glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (za $x = 9$) (vidjeti napomenu pod točkom 7.8.).
- 3.7. Otopina fenoltaleina, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ u etanolu (točka 3.1.).
- 3.8. Mobilna faza za HPLC: smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. 980 + 20 (v + v). Točan se omjer određuje u skladu s osobinama korištene kolone.
- 3.9. Dušik, bez kisika.
- 3.10. DL- α -tokoferol acetat, posebne čistoće, certificiranog djelovanja.
- 3.10.1. Osnovna otopina DL- α -tokoferol acetata: odvagane se 100 mg DL- α -tokoferol acetata (točka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml. Otopi se u etanolu (točka 3.1.) i dopuni istim otapalom do oznake. 1 ml ove otopine sadrži 1 mg DL- α -tokoferol acetata. (Za UV kontrolu vidjeti točku 5.6.1.3., za stabilizaciju vidjeti napomenu pod točkom 7.4.).
- 3.11. DL- α -tokoferol, posebne čistoće, certificiranog djelovanja.
- 3.11.1. Osnovna otopina DL- α -tokoferola: odvagane se 100 mg DL- α -tokoferola (točka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml. Otopi se u etanolu (točka 3.1.) i dopuni istim otapalom do oznake. 1 ml te otopine sadrži 1 mg DL- α -tokoferola. (Za UV kontrolu vidjeti točku 5.6.2.3., za stabilizaciju napomenu pod točkom 7.4.).
- 3.12. 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (vidjeti napomenu pod točkom 7.5.).

4. Oprema

- 4.1. Vakuumski rotacijski otparivač.

▼B

- 4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla.
 - 4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, obujma 500 ml, s vratom od brušenog stakla.
 - 4.2.2. Odmjerne tikvice s ubrušenim čepovima, s uskim vratom, obujma 10 ml, 25 ml, 100 ml i 500 ml.
 - 4.2.3. Lijeenci za odjeljivanje, konusni, obujma 1 000 ml, s ubrušenim čepovima.
 - 4.2.4. Kruškaste tikvice, obujma 250 ml, s ubrušenim čepovima.
- 4.3. Allihnov kondenzator, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina.
- 4.4. Nabrani filter papir za odjeljivanje faza, promjera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za ubrizgavanje.
 - 4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili jednakovrijedna.
 - 4.5.2. UV ili fluorescencijski detektor s mogućnošću promjene valne duljine.
- 4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kivetama od 10 mm.
- 4.7. Vodena kupelj s magnetnom mješalicom.
- 4.8. Naprava za ekstrakciju (vidjeti sliku 1.) koja se sastoji od:
 - 4.8.1. Staklenog valjka obujma 1 litre s vratom od brušenog stakla i čepom.
 - 4.8.2. Uloška od brušenog stakla s bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz središte. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tekućine u valjku može prenijeti u lijevak za odjeljivanje.

5. Postupak

Napomena: Vitamin E osjetljiv je na (UV) svjetlo i oksidaciju. Svi se postupci izvode bez svjetla (u laboratorijskom posuđu od smeđeg stakla ili u staklenim posudama zaštićenim aluminijском folijom) i kisika (ispire se dušikom). Tijekom ekstrakcije zrak iznad tekućine zamijeni se dušikom (povremenim popuštanjem čepa izbjegava se previsoki tlak).

5.1. Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine očice 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje topline. Mljevenje se mora izvesti neposredno prije vaganja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina E.

5.2. Saponifikacija

Ovisno o udjelu vitamina E, odvagane se 2 – 25 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.1.). Uz stalno vrtloženje, jedno za drugim se dodaje 130 ml etanola (točka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (točka 3.12.), 2 ml otopine natrijevog askorbata (točka 3.5.) i 2 ml otopine natrijevog sulfida (točka 3.6.). Na tikvicu se priključi kondenzator (točka 4.3.) i tikvica potopi u vodenu kupelj s magnetnom mješalicom (točka 4.7.). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi uz refluks. Kroz kondenzator (točka 4.3.) se doda 25 ml otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4.) i ostavi uz refluks sljedećih 25 minuta, uz miješanje pod laganom strujom dušika. Zatim se kondenzator ispere s približno 20 ml vode, a udio tikvice ohladi na sobnu temperaturu.

▼B**5.3. Ekstrakcija**

Otopina za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odjeljivanje kapaciteta 1 000 ml (točka 4.2.3.) ili u napravu za ekstrakciju (točka 4.8.), tako što se ispere s ukupno 250 ml vode. Zatim se tikvica za saponifikaciju ispere s 25 ml etanola (točka 3.1.) i 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.) i isprane tekućine prenesu u lijevak za odjeljivanje ili napravu za ekstrakciju. Omjer vode i etanola u pomiješanim otopinama mora biti približno 2:1. Snažno se trese 2 minute, zatim ostavi stajati 2.

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3.)

Kad se slojevi razdvoje (vidjeti napomenu pod točkom 7.3.), sloj laganog petroleja se prenese u drugi lijevak za odjeljivanje (točka 4.2.3). Ekstrakcija se ponovi dvaput sa 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.) i dvaput s 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.).

Pomiješani ekstrakti u lijevku za odjeljivanje isperu se dvaput sa 100 ml vode, uz lagano vrtloženje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano protresivanjem s dodatnim obrocima od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju otopine fenolftaleina (točka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani se ekstrakt filtrira kroz suhi nabrani filter za odjeljivanje faza (točka 4.4.) u građiranu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odjeljivanje i filter se isperu s 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.), dopuni se laganim petrolejem (točka 3.2.) do oznake i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje (vidjeti napomenu pod točkom 7.3.), zamijeni se čep staklenog valjka (točka 4.8.1.) uloškom od brušenog stakla (točka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi odmah iznad razine veznog sklopa. Tlakom koji tvori dušik u bočnoj ručici gornji se sloj laganog petroleja prenese u lijevak za odjeljivanje kapaciteta 1 000 ml (točka 4.2.3.). U stakleni se valjak doda 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.), začepi i dobro protrese. Pričeka se do razdvajanja slojeva, te se gornji sloj prenese u lijevak za odjeljivanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml laganog petroleja (točka 3.2.), zatim dvaput s 50 ml laganog petroleja (točka 3.2.), a slojevi laganog petroleja dodaju u lijevak za odjeljivanje.

Pomiješani se ekstrakti laganog petroleja isperu, u skladu s točkom 5.3.1., zatim se nastavi u skladu s uputama u navedenoj točki.

5.4. Priprema otopine uzorka za HPLC

Alikvotni dio otopine laganog petroleja (iz točke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu obujma 250 ml (točka 4.2.4.). Otapalo se otpari skoro do suhog u rotacijskom otparivaču (točka 4.1.) pri sniženom tlaku i temperaturi kupelji do 40 °C. Dovođenjem dušika (točka 3.9.) uspostavi se atmosferski tlak, a tikvica izvadi iz rotacijskog otparivača. Preostalo se otapalo ukloni strujom dušika (točka 3.9.), a ostatak odmah otopi u poznatom obujmu (10 – 100 ml) metanola (točka 3.3.) (koncentracija DL- α -tokoferola mora biti u području 5 μ /ml do 30 μ /ml).

5.5. Određivanje putem HPLC-a

Vitamin E se razdvaja na koloni C₁₈ s reverznim fazama (točka 4.5.1.), a koncentracija izmjeri fluorescencijskim detektorom (ekscitacija: 295 nm, emisija: 330 nm) ili UV detektorom (292 nm) (točka 4.5.2.).

▼B

Ubrizga se alikvotni dio (npr. 20 µl) otopine metanola dobivene u točki 5.4. i eluira mobilnom fazom (točka 3.8.). Izračuna se srednja vrijednost visina (površina) vršaka za više ubrizgavanja iste otopine uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) vršaka za više ubrizgavanja kalibracijskih otopina (točka 5.6.2.).

Uvjeti za HPLC

Sljedeći uvjeti predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.5.1.): 250 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili jednakovrijedna

Mobilna faza (točka 3.8.): Smjesa metanola (točka 3.3) i vode, npr. 980 + 20 (v + v)

Brzina protoka: 1 – 2 ml/min

Detektor (točka 4.5.2.): Fluorescencijski detektor (ekscitacija: 295 nm/emisija: 330 nm) ili UV detektor (292 nm)

5.6 Kalibracija (*DL-α-tokoferol acetat ili DL-α-tokoferol*)

5.6.1 Standardni *DL-α-tokoferol acetat*

5.6.1.1 *Priprema radne standardne otopine*

Pipetom se prenese 25 ml osnovne otopine *DL-α-tokoferol acetata* (točka 3.10.1.) u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu obujma 500 ml (točka 4.2.1.) i hidrolizira, u skladu s točkom 5.2. Zatim se ekstrahira laganim petrolejem (točka 3.2.) u skladu s točkom 5.3. i laganim petrolejem dopuni do 500 ml. U rotacijskom se otparivaču (vidjeti točku 5.4.) otpari 25 ml tog ekstrakta gotovo do suhog, strujom dušika ukloni preostalo otapalo (točka 3.9.), a ostatak se ponovo otopi u 25,0 ml metanola (točka 3.3.). Nominalna koncentracija te otopine iznosi 45,5 µg *DL-α-tokoferola* na ml, što je jednakovrijedno 50 µg *DL-α-tokoferol acetata* na ml. Radna standardna otopina treba se pripremiti svježa prije upotrebe.

5.6.1.2. *Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje*

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radne standardne otopine u seriju građuiranih tikvica obujma 20 ml, metanolom (točka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih otopina iznose 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 µg/ml *DL-α-tokoferol acetata*, tj. 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 µg/ml *DL-α-tokoferola*.

Više puta se ubrizga 20 µl svake kalibracijske otopine i odrede srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) vršaka pripremi kalibracijska krivulja.

5.6.1.3. *UV standardizacija osnovne otopine DL-α-tokoferol acetata (točka 3.10.1.)*

Etanolom se razrijedi 5,0 ml osnovne otopine *DL-α-tokoferol acetata* (točka 3.10.1.) na 25,0 ml i izmjeri UV spektar te otopine prema etanolu (točka 3.1.) u spektrofotometru (točka 4.6.) između 250 i 320 nm.

Maksimalna apsorpcija je na 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ na } 284 \text{ nm u etanolu}$$

Za tu se razrijeđenost mora dobiti vrijednost ekstinkcije u rasponu od 0,84 do 0,88.

▼B**5.6.2. Standard DL- α -tokoferola****5.6.2.1 Priprema radne standardne otopine**

Pipetom se prenese 2 ml osnovne otopine DL- α -tokoferola (točka 3.11.1.) u građuiranu tikvicu obujma 50 ml, otopi u metanolu (točka 3.3.) i dopuni do oznake metanolom. Nominalna koncentracija ove otopine iznosi 40 μg DL- α -tokoferola na ml, što je jednakovrijedno 44,0 μg DL- α -tokoferol acetata na ml. Radna standardna otopina mora se pripremiti svježa prije upotrebe.

5.6.2.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radne standardne otopine u seriju građuiranih tikvica obujma 20 ml, metanolom (točka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih otopina iznose 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferola, tj. 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 $\mu\text{g/ml}$ DL- α -tokoferol acetata.

Više puta se ubrizga 20 μl svake kalibracijske otopine i odrede srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) vršaka pripremi kalibracijska krivulja.

5.6.2.3. UV standardizacija osnovne otopine DL- α -tokoferola (točka 3.11.1.)

Etanolom se razrijedi 2,0 ml osnovne otopine DL- α -tokoferola (točka 3.11.1.) na 25,0 ml te se izmjeri UV spektar ove otopine prema etanolu (točka 3.1.) u spektrofotometru (točka 4.6.) između 250 i 320 nm. Maksimalna apsorpcija je na 292 nm:

$$E^1_{1\text{ cm}} = 75,8 \text{ na } 292 \text{ nm u etanolu}$$

Za tu se razrijeđenost mora dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,6.

6. Izračun rezultata

Iz srednje se vrijednosti visine (površine) vršaka vitamina E iz otopine uzorka određuje koncentracija otopine uzorka u $\mu\text{g/ml}$ (izračunana kao α -tokoferol acetat) iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.1.2. ili 5.6.2.2.).

Udio vitamina E (w) u mg/kg u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija vitamina E (kao α -tokoferol acetata) u otopini uzorka (točka 5.4.) u $\mu\text{g/ml}$;

V_1 = obujam otopine uzorka (točka 5.4.) u ml;

V_2 = obujam alikvota korištenog u točki 5.4., u ml;

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina E može biti korisno pomiješati ekstrakte laganog petroleja iz dviju šarži za saponifikaciju (izvagana količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za određivanje HPLC-om.

7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (točka 3.1.) za razbijanje emulzije.

▼B

- 7.4. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja otopine DL- α -tokoferol acetata ili otopine DL- α -tokoferola u skladu s točkom 5.6.1.3. ili 5.6.2.3., doda se približno 10 mg BHT-a (točka 3.12.) u otopinu (točka 3.10.1. ili 3.10.2.), a otopina pohrani u hladnjaku (može se držati najviše 4 tjedna).
- 7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrokinon.
- 7.6. Običnom faznom kolonom može se odijeliti α -, β -, γ - i δ -tokoferol.
- 7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.
- 7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.
- 7.9. Acetat vitamina E se u bazičnim uvjetima vrlo brzo hidrolizira, zato je vrlo osjetljiv na oksidaciju, posebno u prisutnosti elemenata u tragovima, poput željeza i bakra. Postupak određivanja vitamina E u premiksima s razinama višim od 5 000 mg/kg može dovesti do razgradnje vitamina E. Zbog toga se za potvrdu preporuča metoda HPLC s enzimskom razgradnjom struktura vitamina E bez alkalne saponifikacije.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 15 % najvišeg rezultata.

9. Rezultati međulaboratorijske studije ⁽¹⁾

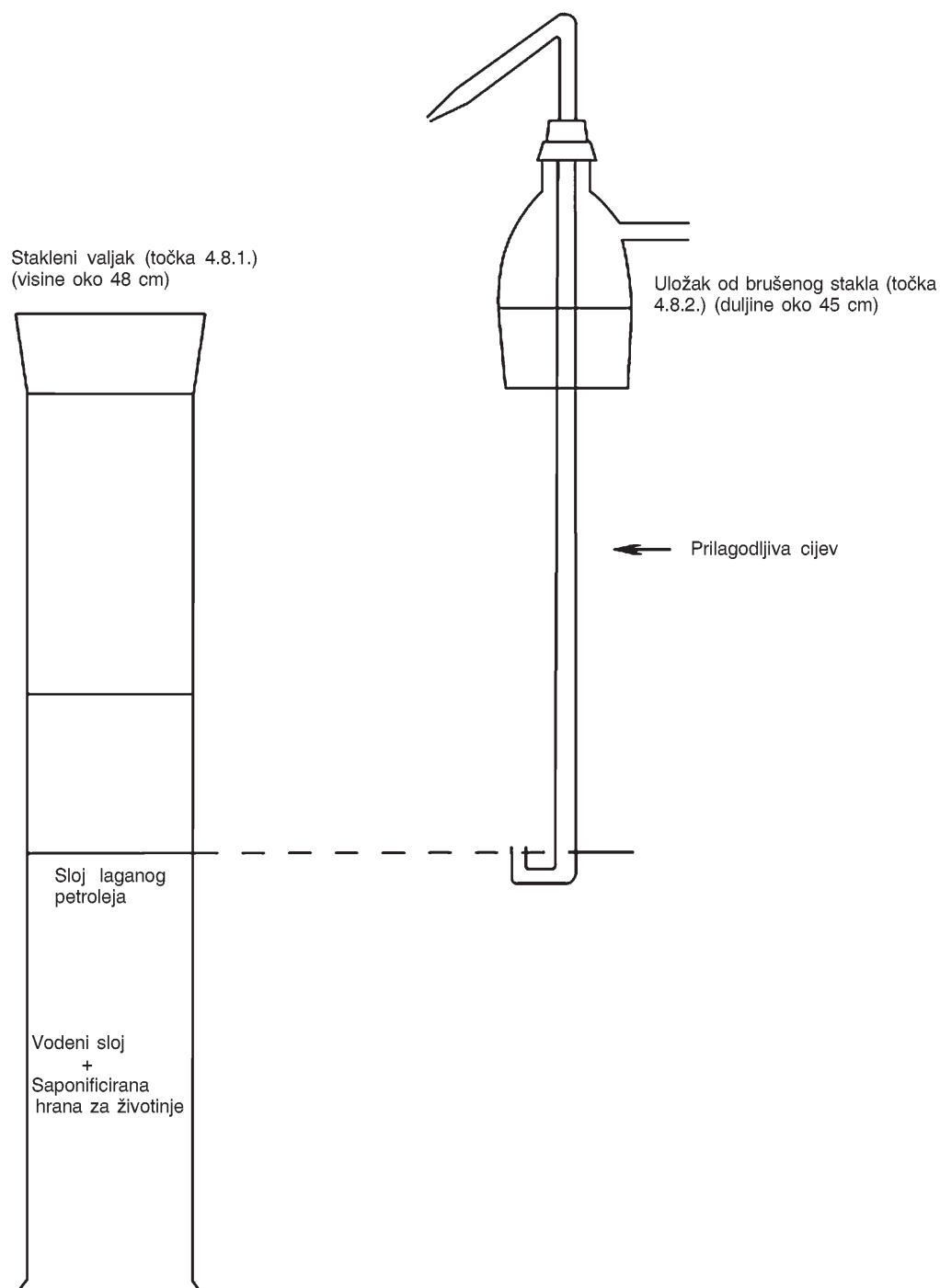
	Premiks	Gotove smjese hrane za stoku	Mineralni koncentrat	Proteinski koncentrat	Hrana za odojke
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Srednja vrijednost [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S _R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = broj laboratorija
 n = broj pojedinačnih vrijednosti
 S_r = standardna devijacija ponovljivosti
 S_R = standardna devijacija obnovljivosti
 r = ponovljivost
 R = obnovljivost
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

⁽¹⁾ Studiju je provela radna skupina za stočnu hranu pri Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



▼B**C. ODREĐIVANJE ŽELJEZA, BAKRA, MANGANA I CINKA U TRAGOVIMA****1. Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje željeza, bakra, mangana i cinka u tragovima u hrani za životinje. Granice za kvantifikaciju su:

— željezo (Fe): 20 mg/kg

— bakar (Cu): 10 mg/kg

— mangan (Mn): 20 mg/kg

— cink (Zn): 20 mg/kg.

2. Načelo

Nakon razgradnje eventualno prisutnih organskih tvari uzorak se otopi u klorovodičnoj kiselini. Nakon primjerenog razrjeđivanja, atomskom se apsorpcijskom spektrometrijom određuju elementi željezo, bakar, mangan i cink.

3. Reagensi*Uvodne napomene*

Za pripremanje reagensa i otopina za analizu koristi se voda bez kationa koje treba odrediti, dobivena dvostrukim destiliranjem vode u destilatoru od borosilikatnog ili kvarcnog stakla ili dvostrukom obradom ionsko-izmjenjivačkom smolom.

Reagensi moraju biti najmanje analitičke čistoće. Odsutnost elementa koji se određuje provjerava se slijepom probom. Prema potrebi se reagensi moraju dodatno pročititi.

Umjesto dolje navedenih standardnih otopina mogu se koristiti komercijalne standardne otopine pod uvjetom da imaju jamstvo i da se prije upotrebe provjere.

3.1. Klorovodična kiselina (d: 1,19 g/ml).

3.2. Klorovodična kiselina (6 mol/l).

3.3. Klorovodična kiselina (0,5 mol/l).

3.4. Fluoridna kiselina 38 – 40 % (v/v) sa sadržajem željeza (Fe) manjim od 1 mg/l i ostatkom nakon otparivanja manjim od 10 mg/l (u obliku sulfata).

3.5. Sumporna kiselina (g: 1,84 g/ml).

3.6. Vodikov peroksid (približno 100 volumnih dijelova kisika (30 % po masi)).

3.7. Standardna otopina željeza (1 000 µg Fe/ml), pripravljena na sljedeći način ili jednakovrijedna komercijalno dostupna otopina: otopi se 1 g željezne žice u 200 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.), doda 16 ml vodikovog peroksida (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.

3.7.1. Radna standardna otopina željeza (100 µg Fe/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.7.) s 9 dijelova vode.

3.8. Standardna otopina bakra (1 000 µg Cu/ml), pripravljena na sljedeći način ili jednakovrijedna komercijalno dostupna otopina:

— otopi se 1 g bakra u prahu u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.), doda 5 ml vodikovog peroksida (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.

3.8.1. Radna standardna otopina bakra (10 µg Cu/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.8.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

▼B

- 3.9. Standardna otopina mangana (1 000 µg Mn/ml), pripravljena na sljedeći način ili jednakovrijedna komercijalno dostupna otopina:

— otopi se 1 g mangana u prahu u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.

- 3.9.1. Radna standardna otopina mangana (10 µg Mn/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.9.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

- 3.10. Standardna otopina cinka (1 000 µg Zn/ml), pripravljena na sljedeći način ili jednakovrijedna komercijalno dostupna otopina:

— otopi se 1 g cinka u obliku folije ili listića u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.

- 3.10.1. Radna standardna otopina cinka (10 µg Zn/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.10.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

- 3.11. Otopina lantanovoga klorida: otopi se 12 g lantanovog oksida u 150 ml vode, doda se 100 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.

4. Oprema

- 4.1. Mufolna peć s regulacijom temperature i po mogućnosti zapisivačem.
- 4.2. Stakleni dijelovi moraju biti od otpornog borosilikata, a preporuča se upotreba opreme koja je namijenjena isključivo određivanju elemenata u tragovima.
- 4.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar koji ispunjava zahtjeve metode glede osjetljivosti i točnosti u potrebnom području.

5. Postupak ⁽¹⁾

- 5.1. *Uzorci koji sadrže organske tvari*

- 5.1.1. Spaljivanje i priprema otopine za analizu ⁽²⁾

- 5.1.1.1. Odvagne se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,2 mg i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine (vidjeti napomenu pod točkom (b)), osuši u sušilu na 105 °C i postavi u hladnu mufolnu peć (točka 4.1.). Peć se zatvori (vidjeti napomenu pod točkom (c)), a temperatura se tijekom 90 minuta postupno digne na 450 – 475 °C. Ta se temperatura zadrži 4 – 16 sati (npr. tijekom noći) kako bi se uklonile ugljične tvari, a zatim se peć otvori i ohladi (vidjeti napomenu pod točkom (d)).

⁽¹⁾ Mogu se koristiti i druge metode za mineralizaciju ako dokazano jamče usporedive rezultate (poput, primjerice, mikrovalne mineralizacije pod tlakom).

⁽²⁾ U zelenoj se krmu (svježoj ili osušenoj) mogu naći velike količine kvarca biljnog podrijetla koji može sadržavati elemente u tragovima koje treba ukloniti. Kod uzoraka takve stočne hrane treba provesti sljedeći izmijenjeni postupak. Provođe se postupci iz točke 5.1.1.1. sve do filtracije. Filtrarski se papir koji sadrži netopljiv ostatak dvaput ispere vrelom vodom i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine. Spali se u mufolnoj peći (točka 4.1.) na temperaturi nižoj od 550 °C do potpunog nestanka svih ugljičnih tvari. Ostavi se da se ohladi, doda se nekoliko kapi vode i 10 – 15 ml fluoridne kiseline (točka 3.4.), zatim se otpari do suhog na otprilike 150 °C. Ako se u ostatku i dalje nalazi kvarcni pijesak, ponovno se otopi u nekoliko mililitara fluoridne kiseline (točka 3.4.) i otpari do suhog. Doda se pet kapljica sumporne kiseline (točka 3.5.) i grije dok ne prestane izlaziti bijeli dim. Nakon dodavanja 5 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i oko 30 ml vode, zagrije se i otopina filtrira u graduiranu tikvicu obujma 250 ml te dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl oko 0,5 mol/l). Nastavi se s utvrđivanjem u skladu s točkom 5.1.2.

▼B

Pepeo se navlaži vodom i prenese u čašu obujma 250 ml. Lončić se ispere s ukupno približno 5 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.), a udio se polako i oprezno prenese u čašu (može doći do burne reakcije zbog tvorbe CO₂). U kapljicama se dodaje klorovodična kiselina (točka 3.1.), uz stalno miješanje dok ne prestane pjenjenje. Otpari se do suhog, uz povremeno miješanje staklenim štapićem.

Zatim se u ostatak doda 15 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i približno 120 ml vode. Promiješa se staklenim štapićem, koji se ostavi u čaši, a čaša se pokrije satnim staklom. Polako se zagrijava do ključanja i ostavi ključati do potpunog otapanja pepela. Filtrira se kroz filter koji ne sadrži pepeo i prikupi u odmjernoj tikvici obujma 250 ml. Čaša i filter se isperu s 5 ml vruće klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dvaput vrelo vodom. Odmjerna se tikvica napuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Ako ostatak na filteru izgleda crn (ugljik), ponovo se stavi u peć i spali na 450 – 475 °C. To je spaljivanje, za koje treba samo nekoliko sati (približno 3 – 5 sati), gotovo kada pepeo postane bijel ili gotovo bijel. Ostatak se otopi s približno 2 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.), otpari se do suhog i doda 5 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.). Zagrije se, otopina se filtrira u građiranu tikvicu i dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

Napomene:

- (a) Pri određivanju elemenata u tragovima važno je biti na oprezu zbog opasnosti od onečišćenja, posebno cinkom, bakrom i željezom. Zbog toga oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ne smije sadržavati navedene kovine.

Kako bi se smanjio opći rizik od onečišćenja treba raditi u atmosferi bez prašine s potpuno čistom opremom i temeljito opranim staklenim posuđem. Određivanje cinka posebno je osjetljivo na više vrsta onečišćenja, npr. staklenim posuđem, reagensima, prašinom itd.

- (b) Masa uzorka koji se spaljuje izračunava se iz približnog udjela elementa u tragovima u hrani za životinje s obzirom na osjetljivost korištenog spektrofotometra. Kod nekih vrsta hrane za životinje s niskim sadržajem elemenata u tragovima trebat će možda započeti s 10 – 20 g uzorka i konačnu otopinu dopuniti do samo 100 ml.

- (c) Spaljivanje se mora izvesti u zatvorenoj peći bez upuhivanja zraka ili kisika.

- (d) Temperatura na pirometru ne smije prijeći 475 °C.

5.1.2. Određivanje spektrofotometrijom

5.1.2.1. Priprema kalibracijske otopine

Za svaki element koji se određuje pripremi se serija kalibracijskih otopina iz standardnih radnih otopina iz točaka 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. i 3.10.1., pri čemu koncentracija HCl u svakoj iznosi približno 0,5 mol/l (i (kod željeza, mangana i cinka) koncentracija lantanovog klorida koja odgovara 0,1 % La (m/v)).

Odabrane koncentracije elemenata u tragovima moraju biti unutar područja osjetljivosti korištenog spektrofotometra. U donjim se tablicama kao primjer navode sastavi tipičnih područja kalibracijskih otopina; međutim, ovisno o vrsti i osjetljivosti korištenog spektrofotometra možda će trebati odabrati drukčije koncentracije.

▼B**Željezo**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml radne standardne otopine (točka 3.7.1.) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							

Bakar

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radne standardne otopine (točka 3.8.1.) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 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 radne standardne otopine (točka 3.9.1.) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							

Cink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml radne standardne otopine (točka 3.10.1.) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							

5.1.2.2. Priprema otopine za analizu

Za određivanje bakra, otopina pripravljena u skladu s točkom 5.1.1. obično se može koristiti izravno. Ako je koncentraciju potrebno prilagoditi tako da bude u području kalibracijskih otopina, pipetom se prenese alikvotni dio u graduiranu tikvicu obujma 100 ml i dopuni do oznake klorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (točka 3.3.).

Za određivanje željeza, mangana i cinka, pipetom se u graduiranu tikvicu obujma 100 ml prenese alikvotni dio otopine pripravljene u skladu s točkom 5.1.1., doda 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuni do oznake klorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (točka 3.3.) (vidjeti također točku 8. „Napomena”).

5.1.2.3. Slijepa proba

Slijepa proba mora obuhvaćati sve propisane korake postupka, osim što se izostavlja uzorak. Kao otopina za slijepu probu ne smije se koristiti kalibracijska otopina „0”.

5.1.2.4. Mjerenje atomske apsorpcije

Oksidacijskim plamenom zrak-acetilen, izmjeri se atomska apsorpcija kalibracijskih otopina i otopine koju treba analizirati, na sljedećim valnim duljinama:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Svako se mjerenje izvodi četiri puta.

5.2. *Mineralna hrana za životinje*

Ako uzorak ne sadrži organske tvari, nije potrebno prethodno spaljivanje. Nastavlja se kako je opisano u točki 5.1.1.1. počevši od drugog stavka. Može se izostaviti otparivanje u prisutnosti fluoridne kiseline.

6. **Izračun rezultata**

Koncentracija elementa u tragovima u otopini koja se analizira izračuna se iz kalibracijske krivulje, a rezultat se iskazuje u miligramima elementa u tragovima na kilogram uzorka (ppm).

7. **Ponovljivost**

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja koje na istom uzorku izvodi isti analitičar ne smije prijeći:

- 5 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima do 50 mg/kg,
- 10 % višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima od 50 – 100 mg/kg,
- 10 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima od 100 – 200 mg/kg,
- 5 % višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima iznad 200 mg/kg.

8. **Napomena**

Prisutnost velike količine fosfata može ometati postupak određivanje željeza, mangana i cinka. Takve se smetnje moraju korigirati dodavanjem otopine lantanovog klorida (točka 3.11.). Ako je, međutim, maseni omjer u uzorku $(Ca + Mg/P) > 2$, može se izostaviti dodavanje otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) u otopinu za analizu i u kalibracijsku otopinu.

D. ODREĐIVANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine halofuginona u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. **Načelo**

Nakon obrade vrućom vodom halofuginon se ekstrahira u obliku slobodne baze u etil acetatu, zatim razdvoji kao hidroklorid u vodenoj otopini kiseline. Ekstrakt se pročisti ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Udio halofuginona određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) reverznih faza uz upotrebu UV detektora.

3. **Reagensi**

- 3.1. Acetonitril, za HPLC.
- 3.2. Smola Amberlite XAD-2.
- 3.3. Amonijev acetat.
- 3.4. Etil acetat.
- 3.5. Ledena octena kiselina.

▼B

3.6. Standardna tvar halofuginon (DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-hidroksi-2-piperidil]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid, E 764).

3.6.1. Osnovna standardna otopina halofuginona, 100 µg/ml

Odvagne se 50 mg halofuginona (točka 3.6.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu obujma 500 ml, otopi u puferskoj otopini amonijevog acetata (točka 3.18.), dopuni puferском otopinom do oznake i promiješa. Ta je otopina stabilna tri tjedna na temperaturi od 5 °C ako se pohrani u tamnom prostoru.

3.6.2. Kalibracijske otopine

U seriju građiranih tikvica obujma 100 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.6.1.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.21.) i promiješa. U tim otopinama koncentracija halofuginona iznosi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.7. Klorovodična kiselina (ρ_{20} približno 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Srebrov nitrat.

3.10. Natrijev askorbat.

3.11. Natrijev karbonat.

3.12. Natrijev klorid.

3.13. EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol).

3.14. Voda, za HPLC.

3.15. Otopina natrijevog karbonata, $c = 10$ g/100 ml.

3.16. Otopina natrijevog karbonata zasićena natrijevim kloridom, $c = 5$ g/100 ml.

U vodi se otopi 50 g natrijevog karbonata (točka 3.11.), razrijedi do 1 litre, zatim se dodaje natrijev klorid (točka 3.12.) do zasićenja otopine.

3.17. Klorovodična kiselina, približno 0,1 mol/l.

Vodom se razrijedi 10 ml HCl (točka 3.7.) do 1 litre.

3.18. Puferška otopina amonijevog acetata, približno 0,25 mol/l.

U vodi (točka 3.14) se otopi 19,3 g amonijevog acetata (točka 3.3.) i 30 ml octene kiseline (točka 3.5.) i razrijedi do 1 litre.

3.19. Priprema smole Amberlite XAD-2.

Vodom se ispere primjerena količina Amberlita (točka 3.2.) dok se ne uklone svi kloridni ioni, što se pokazuje pokusom sa srebrovim nitratom (točka 3.20.) u odbačenoj vodenoj fazi. Zatim se smola ispere s 50 ml metanola (točka 3.8.), metanol se odbaci, a smola pohrani u svježem metanolu.

3.20. Otopina srebrovog nitrata, približno 0,1 mol/l.

Otopi se 0,17 g srebrovog nitrata (točka 3.9.) u 10 ml vode.

3.2.1. Mobilna faza HPLC-a.

Pomiješa se 500 ml acetonitrila (točka 3.1.) s 300 ml puferške otopine amonijevog acetata (točka 3.18.) i 1 200 ml vode (točka 3.14.). Octenom kiselinom (točka 3.5.) se vrijednost pH podesi na 4,3. Filtrira se kroz filter 0,22 µm (točka 4.8.), otopina se otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji). Ta je otopina stabilna mjesec dana ako se drži u zatvorenoj posudi u tamnom prostoru.

▼B**4. Oprema**

- 4.1. Ultrazvučna kupelj
- 4.2. Rotacijski otparivač
- 4.3. Centrifuga
- 4.4. HPLC oprema s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda
 - 4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 300 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna kolona
- 4.5. Staklena kolona (300 mm × 10 mm) s filtrom od sinteriranog stakla i pipcem
- 4.6. Filtri od staklenih vlakana, promjera 150 mm
- 4.7. Membranski filtri, 0,45 µm
- 4.8. Membranski filtri, 0,22 µm

5. Postupak

Napomena: Halofuginon kao slobodna baza je nestabilan u bazičnim i etil-acetatnim otopinama. Ne smije se ostaviti u etil acetatu dulje od 30 minuta.

5.1. Općenito

- 5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nisu prisutni niti halofuginon niti interferentne tvari.
- 5.1.2. Test iskorištenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina halofuginona slična količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije 3 mg/kg u 10 g slijepe probe hrane za životinje doda se 300 µl osnovne standardne otopine (točka 3.6.1.), promiješa i pričeka 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (točka 5.2.).

Napomena: U provedbi ove metode slijepa proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost halofuginona.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se 10 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 0,1 g i prenese u epruvetu za centrifugiranje obujma 200 ml, doda se 0,5 g natrijevog askorbata (točka 3.10.), 0,5 g EDTA (točka 3.13.) i 20 ml vode i promiješa. Epruveta se 5 minuta drži u vodenoj kupelji (80 °C). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se 20 ml otopine natrijevog karbonata (točka 3.15.) i promiješa. Odmah se doda 100 ml etilacetata (točka 3.4.) i 15 sekundi snažno protrese rukom. Zatim se epruveta 3 minute drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) i otpusti slavina. Centrifugira se 2 minute, te se faza etilacetata dekantira kroz filter od staklenih vlakana (točka 4.6.) u lijevak za odjeljivanje obujma 500 ml. Ponovi se ekstrakcija uzorka s dodatnih 100 ml etilacetata. Pomiješani se ekstrakti ispiru 1 minutu s 50 ml otopine natrijevog karbonata zasićene natrijevim kloridom (točka 3.16.), a vodeni se sloj odbaci.

Organski se sloj ekstrahira 1 minutu s 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.17.). Donji se kiselinski sloj prenese u lijevak za odjeljivanje obujma 250 ml. Organski se sloj ponovo ekstrahira 1,5 minutu s dodatnih 50 ml klorovodične kiseline i pomiješa s prvim ekstraktom. Pomiješani se kiselinski ekstrakti približno 10 sekunda ispiru protresivanjem s 10 ml etilacetata (točka 3.4.).

▼B

Vodeni se sloj kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom obujma 250 ml, a organska faza se odbaci. Iz kisele se otopine u rotacijskom otparivaču (točka 4.2.) otpari sav preostali etilacetat. Temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Pod vakuumom na približno 25 milibara, odstrani se sav preostali etilacetat u 5 minuta na 38 °C.

5.3. *Pročišćivanje*

5.3.1. Priprema kolone s Amberlitom

Pripremi se kolona XAD-2 za svaki ekstrakt uzorka. Metanolom (točka 3.8.) se prenese 10 g pripravljenog Amberlita (točka 3.19.) u staklenu kolonu (točka 4.5.). Na vrh posteljice od smole postavi se tampon od staklene vune. Metanol se ispusti iz kolone, a smola ispere sa 100 ml vode tako da se dotok vode zaustavi kada tekućina dosegne vrh posteljice od smole. Prije upotrebe kolona se ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežila. Kolona se nikad ne smije isušiti.

5.3.2. Čišćenje uzorka

Ekstrakt (točka 5.2.) se kvantitativno prenese na vrh pripravljene kolone s Amberlitom (točka 5.3.1.) i eluira, a eluat se odbaci. Brzina eluiranja ne smije biti veća od 20 ml/min. Tikvica s okruglim dnom se ispere s 20 ml klorovodične kiseline (točka 3.17.), a udio iskoristi za ispiranje kolone sa smolom. Preostala se kiselinska otopina ukloni propuhivanjem zraka. Odbaci se tekućina od ispiranja. U kolonu se doda 100 ml metanola (točka 3.8.), 5 – 10 ml se eluira, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom obujma 250 ml. Preostali se metanol ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežio sa smolom te se nastavi eluiranje brzinom koja ne prelazi 20 ml/min, a eluat se prikuplja u istoj tikvici s okruglim dnom. Metanol se otpari na rotacijskom otparivaču (točka 4.2.), pri čemu temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Ostatak se upotrebom mobilne faze (točka 3.21.) kvantitativno prenese u građiranu tikvicu obujma 10 ml. Dopuni se mobilnom fazom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (točka 4.7.). Ta se otopina pohrani za određivanje putem HPLC-a (točka 5.4.).

5.4. *Određivanje putem HPLC-a*

5.4.1. Parametri

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.)

Mobilna faza HPLC-a (točka 3.21.)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Valna duljina detekcije: 243 nm

Volumen za ubrizgavanje: 40 do 100 µl

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine (točka 3.6.2) koncentracije 3,0 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) vršaka i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Svaka se kalibracijska otopina (točka 3.6.2.) ubrizga više puta i za svaku se koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

▼B**5.4.3. Otopina uzorka**

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (točka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijsku otopinu, a zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka halofuginona.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) vršaka halofuginona u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2.).

Udio halofuginona (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

pri čemu je:

c = koncentracija halofuginona u otopini uzorka u µg/ml,

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Vrednovanje rezultata**7.1. Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili upotrebom detektora s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.6.2.) koncentracije 6,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.6.2.). Količina dodanog halofuginona mora biti slična procijenjenoj količini halofuginona u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vršaka halofuginona uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vršaka na polovici maksimalne visine mora biti unutar ± 10 % početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;
- (b) između 225 i 300 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanse. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanse standardnog analita;
- (c) između 225 i 300 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vršaka i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanse. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanse spektra najviše točke.

▼B

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 0,5 mg/kg za udio halofuginona do 3 mg/kg.

7.3. *Iskorištenje*

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80 %.

8. **Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija ⁽¹⁾ u kojoj se u osam laboratorija analiziralo tri uzorka.

Rezultati

	Uzorak A (slijepi) kod prijama	Uzorak B (brašno)		Uzorak C (pelete)	
		Kod prijama	Nakon 2 mjeseca	Kod prijama	Nakon 2 mjeseca
Srednja vrijednost [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 = nije pronađeno

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Rec. = iskorištenje (%).

E. ODREĐIVANJE ROBENIDINA

1,3-bis [(4-klorbenziliden)amino]gvanidin – hidroklorid

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine robenidina u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. **Načelo**

Uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Ekstrakt se osuši i alikvotni dio pročisti na koloni aluminijskog oksida. Robenidin se eluira metanolom iz kolone, koncentrira i dopuni mobilnom fazom do prikladnog obujma. Udio robenidina se određuje tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznim fazama uz upotrebu UV detektora.

3. **Reagensi**

3.1. Metanol.

3.2. Zakiseljeni metanol.

U graduiranu tikvicu obujma 500 ml prenese se 4,0 ml klorovodične kiseline (ρ₂₀ = 1,18 g/ml), dopuni metanolom (točka 3.1.) do oznake i promiješa. Ta se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983., str. 1 252. - 1 256.

▼B

- 3.3. Acetonitril, za HPLC.
- 3.4. Molekularno sito.
- Tip 3A, očice mreže od 8 do 12 (očice promjera 1,6 – 2,5 mm, kristalni aluminijski silikat, promjer pora 0,3 mm).
- 3.5. Aluminijski oksid kiseline aktivnosti I. stupnja, za kolonsku kromatografiju.
- U prikladnu se posudu prenese 100 g aluminijskog oksida i doda 2,0 ml vode. Začepi se i trese približno 20 minuta. Drži se u čvrsto zatvorenoj posudi.
- 3.6. Otopina kalijevog dihidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.
- U vodi se otopi 3,40 g kalijevog dihidrogenfosfata (za HPLC) u odmjernoj tikvici obujma 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.
- 3.7. Otopina dinatrijevog hidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.
- U vodi se otopi 3,55 g bezvodnog dinatrijevog hidrogenfosfata (ili 4,45 g dihidrata ili 8,95 g dodekahidrata) (za HPLC) u odmjernoj tikvici obujma 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.
- 3.8. Mobilna faza HPLC-a.
- Pomiješaju se sljedeći reagensi:
- 650 ml acetonitrila (točka 3.3.),
- 250 ml vode (za HPLC),
- 50 ml otopine kalijevog dihidrogenfosfata (točka 3.6.),
- 50 ml otopine dinatrijevog hidrogenfosfata (točka 3.7.).
- Filtrira se kroz filter 0,22 μ m (točka 4.6.), otopina se zatim otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).
- 3.9. Standardna tvar.
- Čisti robenidin: 1,3-bis[4-klorbenziliden)amino]gvanidin – hidroklorid.
- 3.9.1. Osnovna standardna otopina robenidina: 300 μ g/ml.
- Odvagne se 30 mg standardnog robenidina (točka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg. Otopi se u zakiseljenom metanolu (točka 3.2.) u odmjernoj tikvici obujma 100 ml, dopuni istim otapalom do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na tamno mjesto.
- 3.9.2. Intermedijarna standardna otopina robenidina: 12 μ g/ml
- U graduiranu tikvicu obujma 250 ml prenese se 10,0 ml osnovne standardne otopine robenidina (točka 3.9.1.), dopuni mobilnom fazom (točka 3.8.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na tamno mjesto.
- 3.9.3. Kalibracijske otopine
- U seriju graduiranih tikvica obujma 50 ml prenese se 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.9.2.). Dopuni se mobilnom fazom (točka 3.8.) do oznake i promiješa. Te otopine odgovaraju koncentracijama robenidina od 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 i 6,0 μ g/ml. Te se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.
- 3.10. Voda za HPLC.

▼B**4. Oprema****4.1. Staklena kolona.**

Od smeđeg stakla, s pipcem i spremnikom obujma približno 150 ml, unutarnjeg promjera 10 – 15 mm, dužine 250 mm

4.2. Mehanička tresilica ili magnetska mješalica.**4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač.****4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda s radnim područjem od 250 – 400 nm.****4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijednim.****4.5. Filtar papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili jednakovrijedan).****4.6. Membranski filtri, 0,22 µm.****4.7. Membranski filtri, 0,45 µm.****5. Postupak**

Napomena: Robenidin je osjetljiv na svjetlo. U svim se postupcima mora koristiti posude od smeđeg stakla.

5.1. Općenito**5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan niti robenidin niti interferentne tvari.****5.1.2. Test iskorištenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje (točka 5.1.1.) kojoj se doda količina robenidina slična količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije 60 mg/kg prenese se 3,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.9.1.) u konusnu tikvicu obujma 250 ml. Otopina se otpari u struji dušika do približno 0,5 ml. Doda se 15 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa, ostavi 10 minuta i nastavi s ekstrakcijom (točka 5.2.).**

Napomena: U provedbi ove metode slijepa proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost robenidina.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 15 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu obujma 250 ml, doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.2.), začepi i trese jedan sat u tresilici (točka 4.2.). Otopina se filtrira kroz filtar papir od staklenih vlakana (točka 4.5.) u koničnu tikvicu obujma 150 ml. Doda se 7,5 g molekularnog sita (točka 3.4.), začepi i trese pet minuta. Odmah se filtrira kroz filtar papir od staklenih vlakana. Ova se otopina pohrani za fazu pročišćivanja (točka 5.3.).

5.3. Pročišćivanje**5.3.1. Priprema kolone s aluminijevim oksidom**

U donji dio staklene kolone (točka 4.1.) postavi se mali čep od staklene vune i nabije staklenim štapićem. Odvagne se 11,0 g pripravljenog aluminijevog oksida (točka 3.5.) i prenese u kolonu. Pri tom treba paziti da izloženost zraku tijekom navedenog postupka bude što je moguće manja. Laganim udarcima po donjem dijelu napunjene kolone istaloži se aluminijev oksid.

▼B**5.3.2. Pročišćivanje uzorka**

U kolonu se pipetom prenese 5,0 ml ekstrakta uzorka pripravljenog u (točka 5.2.). Vrh pipete se nasloni na stijenku kolone, zatim se pusti da aluminijev oksid apsorbira otopinu. Robenidin se eluira iz kolone sa 100 ml metanola (točka 3.1.) uz brzinu protoka od 2 – 3 ml/min, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom obujma 250 ml. Otopina metanola se otpari u rotacijskom otparivaču (točka 4.3.) do suhog pri sniženom tlaku, na 40 °C. Ostatak se ponovo otopi u 3 – 4 ml mobilne faze (točka 3.8.) i prenese u građuiranu tikvicu obujma 10 ml. Tikvica se nekoliko puta ispere s obrocima od 1 – 2 ml mobilne faze, a isprana tekućina prenese u građuiranu tikvicu. Dopuni se istim otapalom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.7.). Ova se otopina pohrani za određivanje putem HPLC-a (točka 5.4.).

5.4. Određivanje putem HPLC-a**5.4.1 Parametri**

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati:

kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.),

Mobilna faza HPLC (točka 3.8.),

brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min,

valna duljina detekcije: 317 nm,

ubrizgani volumen: 20 – 50 µl.

Stabilnost kromatografskog sustava se provjerava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine (točka 3.9.3.) koncentracije 3,6 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine vršaka i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.9.3.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (točka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka robenidina.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visina (površina) vršaka robenidina u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2.).

Udio robenidina (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija robenidina u otopini uzorka u µg/ml,

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

▼B**7. Vrednovanje rezultata****7.1. Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.9.3.) koncentracije 6 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.9.3.). Količina dodanog robenidina mora biti slična procijenjenoj količini robenidina u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vrška robenidina uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrška na polovici maksimalne visine mora biti unutar približno 10 % početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar približno 2 nm;
- (b) između 250 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanice. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanice standardnog analita;
- (c) između 250 i 400 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanice. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanice spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 10 % vrijednosti višeg rezultata za udio robenidina viši od 15 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 85 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija na razini EZ-a u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za perad i kuniće u obliku brašna i peleta. Svaki se uzorak analizirao dvaput. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

▼B

	Hrana za perad		Hrana za kuniće	
	Brašno	Pelete	Brašno	Pelete
Srednja vrijednost [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
Iskorištenje [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardna devijacija ponovljivosti,
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %,
 S_R = standardna devijacija obnovljivosti,
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

F. ODREĐIVANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitril

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine diklazurila u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije iznosi 0,1 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,5 mg/kg.

2. Načelo

Nakon dodavanja internog standarda, uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Kod hrane za životinje alikvotni se dio ekstrakta pročisti na kartuši C_{18} za ekstrakciju u krutoj fazi. Diklazuril se eluira iz kartuše smjesom zakiseljenog metanola i vode. Nakon otparivanja, ostatak se otopi u smjesi DMF/voda. Kod premiksa, ekstrakt se otpari, a ostatak otopi u smjesi DMF/voda. Udio diklazurila određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom i ternarnim gradijentom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Voda, za HPLC.

3.2. Amonijev acetat.

3.3. Tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBHS).

3.4. Acetonitril, za HPLC.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. N,N-dimetilformamid (DMF).

3.7. Klorovodična kiselina, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8. Standardna tvar: Diklazuril II-24: (+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetonitril, zajamčene čistoće, E771.

3.8.1. Osnovna standardna otopina diklazurila, 500 $\mu\text{g/ml}$.

Odvagne se 25 mg standardne tvari diklazurila (točka 3.8.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu obujma 50 ml. Otopi se u DMF-u (točka 3.6.), tikvica se dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Pri temperaturi ≤ 4 °C otopina je stabilna 1 mjesec.

▼B

3.8.2. Standardna otopina diklazurila, 50 µg/ml.

U graduiranu tikvicu obujma 50 ml prenese se 5,00 ml osnovne standardne otopine (točka 3.8.1.), dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9. Interni standard: 2,6 diklor- α -(4-klorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H)- il) α -metilbenzen-acetonitril.

3.9.1. Osnovna otopina internog standarda, 500 µg/ml.

Odvagne se 25 mg internog standarda (točka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 50 ml. Otopi se u DMF-u (točka 3.6.), tikvica se dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.2. Otopina internog standarda, 50 µg/ml.

U graduiranu tikvicu obujma 50 ml prenese se 5,00 ml osnovne otopine internog standarda (točka 3.9.1.), dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.3. Otopina internog standarda za premikse, p/1000 mg/ml.

(p = nominalni udio diklazurila u premiksu, u mg/kg)

Odvagne se p/10 mg internog standarda s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml, otopi u DMF-u (točka 3.6.) u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.6.), dopuni DMF-om do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.10. Kalibracijska otopina, 2 µg/ml.

Pipetom se prenese 2,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu obujma 50 ml. Doda se 16 ml DMF (točka 3.6.), tikvica se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.11. Kartuša C₁₈ za ekstrakciju u krutoj fazi, npr. Bond Elut, veličina: 1 cc, masa apsorbenta: 100 mg.

3.12. Ekstrakcijsko otapalo: zakiseljeni metanol.

Pipetom se prenese 5,0 ml klorovodične kiseline (točka 3.7.) u 1 000 ml metanola (točka 3.5.) i promiješa.

3.13. Mobilna faza za HPLC.

3.13.1. Eluent A: otopina amonijevog acetata i tetrabutilamonijevog hidrogen sulfata.

Otopi se 5 g amonijevog acetata (točka 3.2.) i 3,4 g TBHS-a (točka 3.3.) u 1 000 ml vode (točka 3.1.) i promiješa.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (točka 3.4.).

3.13.3. Eluent C: metanol (točka 3.5.).

▼B**4. Oprema**

- 4.1. Mehanička tresilica
- 4.2. Oprema za HPLC s ternarnim gradijentom
 - 4.2.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm, 100 mm × 4,6 mm ili jednakovrijedna
 - 4.2.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda.
- 4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač
- 4.4. Membranski filter, 0,45 µm
- 4.5. Vakuumski ventil
- 4.6. Ultrazvučna kupelj

5. Postupak**5.1. Općenito****5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje**

Analizom slijepa probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan niti diklazuril niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost diklazurila ili interferentnih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja izvodi se analizom slijepa probe hrane za životinje kojoj se doda količina diklazurila slična količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije 1 mg/kg doda se 0,1 ml osnovne standardne otopine (točka 3.8.1.) u 50 g slijepa probe hrane za životinje, temeljito promiješa i ostavi 10 minuta, a prije nastavka (točka 5.2.) se miješanje više puta ponovi.

Ako nije dostupna slijepa probe hrane za životinje slična uzorku (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se provesti metodom dodavanja standarda. U tom se slučaju uzorku za analizu doda količina diklazurila slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodanog diklazurila, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija**5.2.1. Hrana za životinje**

Odvagne se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu obujma 500 ml, doda 1,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) i 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smjesa se tijekom noći protresa u tresilici (točka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U primjerenu staklenu posudu prenese se alikvot 20 ml supernatanta i razrijedi s 20 ml vode. Ta se otopina prenese u ekstrakcijsku kartušu (točka 3.11.) i filtrira pod vakuumom (točka 4.5.). Kartuša se ispere s 25 ml smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.) i vode, 65 + 35 (V + V). Prikupljene se frakcije odbace, a spojevi eluiraju s 25 ml smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.) i vode, 80 + 20 (V + V). Ova se frakcija isparava u rotacijskom otparivaču (točka 4.3) pri 60 °C dok se ne počne sušiti. Ostatak se otopi u 1,0 ml DMF-a (točka 3.6), doda se 1,5 ml vode (točka 3.1.) i promiješa. Filtrira se kroz membranski filter (točka 4.4.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g. Prenese se u konusnu tikvicu obujma 500 ml, doda se 1,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.3.) i 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smjesa se tijekom noći protresa u tresilici (točka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U primjereno veliku staklenu tikvicu s okruglim dnom prenese se alikvot (10 000/p ml, p = nominalna udio diklazurila u mg/kg u premiksi) supernatanta. Otparava se pod

▼B

sniženim tlakom na 60 °C u rotacijskom otparivaču (točka 4.3.) dok se ne počne sušiti. Ostatak se ponovno otopi u 10,0 ml DMF-a (točka 3.6.), doda se 15,0 ml vode (točka 3.1.) i promiješa. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. *Određivanje putem HPLC-a*

5.3.1. *Parametri*

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 μm ili jednakovrijedna
Mobilna faza:	Eluent A (točka 3.13.1.): vodena otopina amonijevog acetata i tetrabutilamonijevog hidrogen sulfata Eluent B (točka 3.13.2.): acetonitril Eluent C (točka 3.13.3.): metanol
Način eluiranja:	— linearni gradijent — početni uvjeti: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — nakon 10 minuta, elucija s gradijentom tijekom 30 minuta do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Ispiranje 10 minuta s B.
Brzina protoka:	1,5 – 2 ml/min
Volumen za ubrizgavanje:	20 μl
Valna duljina detekcije:	280 nm

Stabilnost kromatografskog sustava se provjerava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine koncentracije 2,0 μg/ml (točka 3.10.) sve dok se ne dobiju konstantne visine vršaka i konstantna vremena retencije.

5.3.2. *Kalibracijska otopina*

Više puta se ubrizga kalibracijska otopina (točka 3.10.) i odredi srednja vrijednost visine (površine) vršaka diklaurila i internog standarda.

5.3.3. *Otopina uzorka*

Više puta se ubrizga 20 μl kalibracijske otopine (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) i odredi srednja vrijednost visine (površine) vršaka diklaurila i internog standarda.

6. **Izračun rezultata**

6.1. *Hrana za životinje*

Udio diklaurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times v \times 10}{m} [\text{mg/kg}]$$

▼B

pri čemu je:

- $h_{d,s}$ = visina (površina) vrška diklazurila u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
 $h_{i,s}$ = visina (površina) vrška internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
 $h_{d,c}$ = visina (površina) vrška diklazurila u kalibracijskoj otopini (točka 3.10.)
 $h_{i,c}$ = visina (površina) vrška internog standarda u kalibracijskoj otopini (točka 3.10.)
 $c_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracijskoj otopini u $\mu\text{g/ml}$ (točka 3.10.)
 m = masa pokusnog uzorka u gramima
 V = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.1 (tj. 2,5 ml).

6.2. Premiksi

Udio diklazurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

- $h_{d,c}$ = visina (površina) vrška diklazurila u kalibracijskoj otopini (točka 3.10.)
 $h_{i,c}$ = visina (površina) vrška internog standarda u kalibracijskoj otopini (točka 3.10.)
 $h_{d,s}$ = visina (površina) vrška diklazurila u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
 $h_{i,s}$ = visina (površina) vrška internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
 $c_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracijskoj otopini u $\mu\text{g/ml}$ (točka 3.10.)
 m = masa pokusnog uzorka u gramima
 V = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.2 (tj. 25 ml)
 p = nominalna udio diklazurila u mg/kg u premiksi.

7. Vrednovanje rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.10.).

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.10.). Količina dodanog diklazurila mora biti slična količini diklazurila određenoj u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vršaka diklazurila i internog standarda uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrška na polovici visine mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine vrška diklazurila ili vrška internog standarda ekstrakta uzorka bez dodatka.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) Valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm 2\text{ nm}$.

▼B

- (b) Između 230 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance standardnog analita.
- (c) Između 230 i 320 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 30 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila između 0,5 – 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg za udio diklazurila između 2,5 – 5 mg/kg,
- 15 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila veći od 5 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija u kojoj se u 11 laboratorija analiziralo 5 uzoraka. Ti su se uzorci sastojali od dva premiksa; jedan je bio pomiješan s organskom matricom (O 100), a drugi s anorganskom matricom (A 100). Teoretski udio iznosi 100 mg diklazurila na kg. Tri različita proizvođača (NL) (L1/Z1/K1) proizvela su 3 mješavine hrane za perad. Teoretski udio iznosi 1 mg diklazurila na kg. Od laboratorija je zatraženo da svaki uzorak analiziraju jedanput ili dvaput. (Detaljnije informacije o navedenoj međulaboratorijskoj studiji mogu se pronaći u *Journal of AOAC International*, svezak 77, br. 6, 1994., str. 1 359. – 1 361.). Rezultati su prikazani u donjoj tablici.

	Uzorak 1 A 100	Uzorak 2 O 100	Uzorak 3 L1	Uzorak 4 Z1	Uzorak 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Srednja vrijednost	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominalni udio (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

S_r = standardna devijacija ponovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti

▼B

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

9. **Napomena**

Prethodno treba dokazati da je odziv diklazurila linearan u području koncentracija koje se mjere.

G. ODREĐIVANJE LASALOCID NATRIJA

Natrijeva sol polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi Streptomyces lasaliensis

1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine lasalocid natrija u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije iznosi 5 mg/kg, a granica kvantifikacije 10 mg/kg.

2. **Načelo**

Lasalocid natrij se ekstrahira iz uzorka u zakiseljeni metanol i određuje tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu spektrofotometrijskog detektora.

3. **Reagensi**

3.1. Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4).

3.2. Ortofosforna kiselina, m (m/m) = 85 %.

3.3. Otopina ortofosforne kiseline, c = 20 %.

23,5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.2.) razrijedi se vodom do 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), m (m/m) = 99 %.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. Klorovodična kiselina, gustoća = 1,19 g/ml.

3.7. Otopina fosfatnog pufera, c = 0,01 mol/l.

Otopi se 1,36 g KH_2PO_4 (točka 3.1.) u 500 ml vode (točka 3.11.), doda se 3,5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.2.) i 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (točka 3.4.). Otopinom ortofosforne kiseline (točka 3.3.) pH vrijednost se podesi na 4,0 i razrijedi vodom (točka 3.11.) do 1 000 ml.

3.8. Zakiseljeni metanol.

U graduiranu tikvicu obujma 1 000 ml prenese se 5,0 ml klorovodične kiseline (točka 3.6.), dopuni metanolom (točka 3.5.) do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.9. Mobilna faza HPLC-a, otopina fosfatnog pufera i metanola 5 + 95 (V + V).

Pomiješa se 5 ml otopine fosfatnog pufera (točka 3.7.) s 95 ml metanola (točka 3.5.).

3.10. Lasalocid natrij standardna tvar, zajamčene čistoće, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (natrijeva sol polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Osnovna standardna otopina lasalocid natrija, 500 $\mu g/ml$

Odvagne se 50 mg lasalocid natrija (točka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 100 ml, otopi u zakiseljenom metanolu (točka 3.8.) i istim otapalom dopuni do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

▼B**3.10.2. Intermedijarna standardna otopina lasalocid natrija, 50 µg/ml**

Pipetom se prenese 10,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.10.1.) u graduiranu tikvicu obujma 100 ml i zakiseljenim metanolom (točka 3.8.) dopuni do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica obujma 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.10.2.). Zakiseljenim se metanolom dopuni do oznake (točka 3.8.) i promiješa. Ove otopine odgovaraju 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 µg lasalocid natrija na ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.11. Voda, za HPLC**4. Oprema****4.1. Ultrazvučna kupelj (ili vodena kupelj s protresanjem) s nadzorom temperature****4.2. Membranski filtri, 0,45 µm****4.3. Oprema za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC) sa sustavom za ubrizgavanje primjerenim za ubrizgavanje volumena od 20 µl****4.3.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju 125 mm × 4 mm, reverzna faza C₁₈, veličina čestica punjenja 5 µm ili jednakovrijedna****4.3.2. Spektrofluorimetar s mogućnošću promjene valne duljine (ekscitacije i emisije)****5. Postupak****5.1. Općenito****5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje**

Za provedbu testa iskorištenja (točka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni niti lasalocid natrij, niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost lasalocid natrija i interferentnih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine lasalocid natrija slične količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije 100 mg/kg prenese se 10,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.10.1.) u konusnu tikvicu obujma 250 ml i otopina otpari do približno 0,50 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, temeljito promiješa i ostavi 10 minuta, a prije koraka ekstrakcije miješanje se više puta ponovi (točka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se provesti metodom dodavanja standarda. U tom se slučaju uzorku za analizu doda količina lasalocid natrija slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Ovaj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodanog lasalocid natrija, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija**5.2.1. Hrana za životinje**

Odvagne se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu obujma 250 ml s čepom. Pipetom se doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.8.). Poklopac se lagano zatvori i tikvica protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Ostavi se približno 1 sat dok se suspenzija ne

▼B

istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.2.) u prikladnu posudu. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 2 g neusitnjenog premiksa s preciznošću od 0,001 g i prenese u građiranu tikvicu obujma 250 ml. Doda se 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.8.), tikvica se protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se sa sadržajem drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Zakiseljenim se metanolom (točka 3.8.) razrijedi do oznake i dobro promiješa. Ostavi se 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.2.). Prikladan obujam čistog filtrata razrijedi se zakiseljenim metanolom (točka 3.8.), čime se dobiva konačna pokusna otopina koncentracije približno 4 µg/ml lasalocid natrija. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. *Određivanje putem HPLC-a*

5.3.1. Parametri

Sljedeći uvjeti predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati:

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.3.1.):	125 mm × 4 mm, povratna faza C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 µm ili jednakovrijedna
Mobilna faza (točka 3.9.):	Smjesa otopine fosfatnog pufera (točka 3.7.) i metanola (točka 3.5.), 5 + 95 (V + V)
Brzina protoka:	1,2 ml/min
Valna duljina detekcije:	
Ekscitacija:	310 nm
Emisija:	419 nm
Volumen za ubrizgavanje:	20 µl

Stabilnost kromatografskog sustava provjerava se višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine koncentracije 4,0 µg/ml (točka 3.10.3.) sve dok se ne postignu konstantne visine (ili površine) vršaka i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.10.3.) i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizgaju ekstrakti uzorka dobiveni u točki 5.2.1. ili 5.2.2., pri čemu se koristi jednak obujam kao za kalibracijsku otopinu i odrede srednje vrijednosti visina (površina) vršaka lasalocid natrija.

6. Izračun rezultata

Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) vršaka dobivenih ubrizgavanjem otopine uzorka (točka 5.3.3.) određuje koncentracija lasalocid natrija (µg/ml) iz kalibracijske krivulje.

▼B**6.1. Hrana za životinje**

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.1.) u µg/ml

V₁ = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.1. u ml (tj. 100)

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.2.) u µg/ml

V₂ = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.2. u ml (tj. 250)

f = faktor razrjeđenja u skladu s 5.2.2.

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Vrednovanje rezultata**7.1. Identifikacija**

Metode koje se temelje na spektrofotometriji manje su podložne interferencijama od metoda kod kojih se koristi UV detekcija. Identifikacija analita može se potvrditi ko-romatografijom.

7.1.1. Ko-kromatografija

Ekstraktu uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.10.3.). Količina dodanog lasalocid natrija mora biti slična količini lasalocid natrija u ekstraktu uzorka. Smije se povećati samo visina vrška lasalocid natrija uzimajući u obzir količine dodanog lasalocid natrija i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrha, na polovici visine, mora biti unutar ± 10 % početne vrijednosti širine vrha dobivene iz ekstrakta uzorka bez dodanog lasalocid natrija.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 15 % više vrijednosti za udio lasalocid natrija od 30 – 100 mg/kg,

— 15 mg/kg za udio lasalocid natrija od 100 – 200 mg/kg,

— 7,5 % više vrijednosti za udio lasalocid natrija veći od 200 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80 %. Za obogaćene uzorke premiksa iskorištenje mora iznositi najmanje 90 %.

▼B**8. Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija (*) u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo 2 premiksa (uzorci 1 i 2) i 5 uzoraka hrane za životinje (uzorci 3 – 7). Svaki se uzorak analizirao dva puta. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

	Uzorak 1 Premiks za piliće	Uzorak 2 Premiks za purane	Uzorak 3 Granulat za purane	Uzorak 4 Mrvice za piliće	Uzorak 5 Hrana za purane	Uzorak 6 Hrana za perad A	Uzorak 7 Hrana za perad B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrijednost [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
Nominalni udio [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Udio koji je naveo proizvođač.

(**) Hrana za životinje pripremljena u laboratoriju.

L = broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

s_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

(*) Analyst, 1995., 120, 2 175. - 2 180.



PRILOG V.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU NEPOŽELJNIH TVARI U HRANI ZA ŽIVOTINJE

A. ODREĐIVANJE SLOBODNOG I UKUPNOG GOSIPOLA

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine slobodnog i ukupnoga gosipola te kemijski srodnih tvari u sjemenu pamuka i u brašnu i pogači od pamukovog sjemena te u krmnim smjesama koje sadrže navedene sirovine za hranu za životinje, kada je koncentracija slobodnog i ukupnoga gosipola te kemijski srodnih tvari veća od 20 mg/kg.

2. Načelo

Gosipol se ekstrahira u prisutnosti 3-aminopropan-1-ola, bilo smjesom propan-2-ola i heksana kod određivanja slobodnoga gosipola, bilo dime-tilformamidom kod određivanja ukupnoga gosipola. Gosipol se anilinom pretvori u gosipol-dianilin, čija se optička gustoća mjeri na 440 nm.

3. Reagensi

3.1. Smjesa propan-2-ol-heksana: pomiješa se 60 volumnih dijelova propan-2-ola s 40 volumnih dijelova n-heksana.

3.2. Otapalo A: U graduiranu tikvicu obujma 1 l doda se približno 500 ml smjese propan-2-ol-heksana (točka 3.1.), 2 ml 3-aminopropan-1-ola, 8 ml ledene octene kiseline i 50 ml vode. Dopuni se do oznake smjesom propan-2-ola i heksana (točka 3.1.). Ovaj je reagens stabilan tjedan dana.

3.3. Otapalo B: U graduiranu tikvicu obujma 100 ml pipetom se prenese 2 ml 3-aminopropan-1-ola i 10 ml ledene octene kiseline. Ohladi se na sobnu temperaturu i dopuni do oznake N,N-dimetilformamidom. Ovaj je reagens stabilan tjedan dana.

3.4. Anilin: *Ako optička gustoća u slijepom pokusu prelazi 0,022*, anilin se destilira iznad cinka u prahu, pri čemu se odbaci prva i zadnja frakcija od 10 % destilata. Ako se reagens drži u hladnjaku u zatvorenoj posudi od smeđeg stakla, može se održati nekoliko mjeseci.

3.5. Standardna otopina gosipola A: U graduiranu tikvicu obujma 250 ml doda se 27,9 mg gosipol acetata. Otopi se i dopuni otapalom A (točka 3.2.) do oznake. Pipetom se prenese 50 ml te otopine u graduiranu tikvicu obujma 250 ml i dopuni otapalom A do oznake. Koncentracija gosipola u toj otopini iznosi 0,02 mg/ml. Prije uporabe otopina se ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi.

3.6. Standardna otopina gosipola B: U graduiranu tikvicu obujma 50 ml doda se 27,9 mg gosipol acetata. Otopi se i dopuni otapalom B (točka 3.3.) do oznake. Koncentracija gosipola u toj otopini iznosi 0,5 mg/ml.

Ako se zaštite od svjetla, standardne su otopine gosipola A i B stabilne 24 sata.

4. Oprema

4.1. Mješalica (rotacijska): približno 35 okr./min.

▼B

4.2. Spektrofotometar

5. **Postupak**5.1. *Pokusni uzorak*

Količina korištenog pokusnog uzorka ovisi o očekivanom udjelu gosipola u uzorku. Poželjno je koristiti mali pokusni uzorak i relativno velik alikvot filtrata tako da se dobije dovoljna količina gosipola za točna fotometrijska mjerenja. *Kod određivanja slobodnoga gosipola* u sjemenu pamuka i brašnu i pogači od pamukovog sjemena, količina pokusnog uzorka ne prelazi 1 g; za krmnu smjesu količina može biti do 5 g. U većini je primjera prikladan alikvot filtrata od 10 ml; isti sadrži 50 – 100 µg gosipola. *Kod određivanja ukupnoga gosipola*, pokusni uzorak iznosi 0,5 – 5 g, tako da alikvot filtrata od 2 ml sadrži 40 – 200 µg gosipola.

Analiza se provodi na sobnoj temperaturi od približno 20 °C.

5.2. *Određivanje slobodnoga gosipola*

Pokusni se uzorak prenese u tikvicu s brušenim vratom obujma 250 ml, čije je dno prekriveno drobljenim staklo. Pipetom se doda 50 ml otapala A (točka 3.2.), tikvica se zatvori i miješa jedan sat u mješalici. Filtrira se kroz suhi filtar i filtrat prikupi u maloj tikvici s brušenim vratom. Tijekom filtriranja lijevak se prekrije satnim staklom.

Pipetom se u svaku od dvije odmjerene tikvice obujma 25 ml (A i B) prenesu jednaki alikvoti filtrata, koji sadrže 50 – 100 µg gosipola. Prema potrebi se dopune otapalom A (točka 3.2.) do 10 ml. Tikvica (A) se do oznake dopuni smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.). Ova se otopina koristi kao referentna otopina za mjerenje otopine uzorka.

Pipetom se u svaku od dvije ostale odmjerene tikvice obujma 25 ml (C i D) prenesu 10 ml otapala A (točka 3.2.). Tikvica (C) se do oznake dopuni smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.). Ova se otopina koristi kao referentna otopina za mjerenje otopine slijepe probe.

U tikvice (D) i (B) se doda po 2 ml anilina (točka 3.4.). Grije se 30 minuta nad vrelom vodenom kupelji, do obojenja. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.), homogenizira i ostavi jedan sat.

Optička gustoća otopine iz slijepe probe (D) odredi se usporedbom s referentnom otopinom (C), a optička gustoća otopine uzorka (B) usporedbom s referentnom otopinom (A) u spektrofotometru na 440 nm sa staklenim kivetama veličine 1 cm.

Oduzme se optička gustoća otopine slijepe probe od optičke gustoće otopine uzorka (= korigirana optička gustoća). Iz te se vrijednosti izračunava udio slobodnoga gosipola, u skladu s točkom 6.

5.3. *Određivanje ukupnoga gosipola*

U odmjernu se tikvicu obujma 50 ml prenese pokusni uzorak s 1 – 5 mg gosipola i doda 10 ml otapala B (točka 3.3.). Istodobno se pripremi slijeпа proba, tako da se u drugu graduiranu tikvicu obujma 50 ml prenesu 10 ml otapala B (točka 3.3.). Obje se tikvice griju 30 minuta

▼B

iznad vrele vodene kupelji. Ohlade se na sobnu temperaturu, svaka se tikvica dopuni do oznake smjesom propan-2-ola i heksana (točka 3.1.). Homogenizira se i ostavi 10 – 15 minuta da se istaloži, zatim se filtrira u tikvicu s brušenim vratom.

U dvije se odmjerne tikvice obujma 25 ml pipetom prenese po 2 ml filtrata uzorka, a u druge dvije odmjerne tikvice obujma 25 ml po 2 ml filtrata slijepe probe. Po jedna se tikvica iz svake serije dopuni do 25 ml smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.). Ove se otopine koriste kao referentne otopine.

U svaku od preostalih dviju tikvica doda se 2 ml anilina (točka 3.4.). Zagrijavaju se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni smjesom propan-2-ola i heksana (točka 3.1.) do 25 ml, homogenizira i ostavi jedan sat.

Optička gustoća slobodnoga gosipola određuje se u skladu s točkom 5.2. Iz te se vrijednosti izračunava udio ukupnoga gosipola, u skladu s točkom 6.

6. Izračun rezultata

Rezultati se mogu izračunati bilo iz specifične optičke gustoće (točka 6.1.) ili iz kalibracijske krivulje (točka 6.2.).

6.1. Iz specifične optičke gustoće

Specifične optičke gustoće, pri opisanim uvjetima, su sljedeće:

$$\text{Slobodni gosipol: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Ukupni gosipol: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Udio slobodnog ili ukupnoga gosipola u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$\% \text{ gosipol : } \frac{E \times 1250}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times p \times a}$$

pri čemu je:

E = korigirana optička gustoća određena u skladu s točkom 5.2.,
 p = masa pokusnog uzorka u gramima,
 a = alikvot filtrata u mililitrima.

6.2. Iz kalibracijske krivulje

6.2.1. Slobodni gosipol

Pripreme se 2 serije po pet graduiranih tikvica obujma 25 ml. U svaku seriju tikvica pipetom se prenesu alikvoti od 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml standardne otopine gosipola A (točka 3.5.). Otapalom A (točka 3.2.) se dopuni do 10 ml. Svaka se serija dopuni jednom odmjernom tikvicom obujma 25 ml koja sadrži samo 10 ml otapala A (točka 3.2.) (slijepa proba).

Tikvice iz prve serije (uključujući tikvicu za slijepu probu) dopune se do 25 ml smjesom propan-2-ola i heksana (točka 3.1.) (referentna serija).

▼B

U svaku tikvicu iz druge serije (uključujući tikvicu za slijepu probu) doda se 2 ml anilina (točka 3.4.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.), homogenizira i ostavi jedan sat (standardna serija).

Optička gustoća otopina iz standardne serije i odgovarajućih otopina iz referentne serije odredi se u skladu s točkom 5.2. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće u odnosu na količine gosipola (u µg).

6.2.2. Ukupni gosipol

Pripremi se šest građuiranih tikvica obujma 50 ml. U prvu se tikvicu prenese 10 ml otapala B (točka 3.3.), a u ostale 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml standardne otopine gosipola B (točka 3.6.). Svaka se tikvica dopuni do 10 ml otapalom B (točka 3.3.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.) i homogenizira.

Prenese se po 2,0 ml svake od navedenih otopina u svaku od dvije serije od po šest građuiranih tikvica obujma 25 ml. Tikvice iz prve serije dopune se do 25 ml smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.) (referentna serija).

U svaku tikvicu iz druge serije doda se 2 ml anilina (točka 3.4.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1.), homogenizira i ostavi jedan sat (standardna serija).

Optička gustoća otopina iz standardne serije i odgovarajućih otopina iz referentne serije odredi se u skladu s točkom 5.2. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće u odnosu na količine gosipola (u µg).

6.3. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 15 % više vrijednosti za udio gosipola manji od 500 ppm,

— 75 ppm apsolutne vrijednosti za udio gosipola od 500 – 750 ppm,

— 10 % više vrijednosti za udio gosipola veći od 750 ppm.

▼M4

B. ODREĐIVANJE RAZINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-ova

POGLAVLJE I.

Metode uzorkovanja i tumačenje rezultata analize

1. Svrha i područje primjene

Uzorci za službenu kontrolu razina polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD), polikloriranih dibenzofurana (PCDF), polikloriranih bifenila sličnih dioksinu (PCB) ⁽¹⁾ i PCB-ova koji nisu slični dioksinu u hrani uzimaju se u skladu s odredbama Priloga I. Primjenjuju se količinski zahtjevi za kontrolu tvari ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje kako je predviđeno točkom 5.1. Priloga I. Skupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnim za serije i podserije iz kojih su uzeti. Sukladnost s najvišim razinama određenim Direktivom 2002/32/EZ utvrđuje se na temelju razina utvrđenih na laboratorijskim uzorcima.

Za potrebe ovog dijela B, primjenjuju se definicije utvrđene u Prilogu I. Odluci Komisije 2002/657/EZ ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za dioksine, furane i PCB-ove slične dioksinu:

WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost kemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u lipnju 2005. (Martin van den Berg et al., Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i spojeve slične dioksinu kod ljudi i sisavaca Svjetske zdravstvene organizacije, provedena 2005. Toksikološke znanosti 93(2), 223.–241. (2006.))

Kongener	Vrijednost TEF-a	Kongener	Vrijednost TEF-a
<i>Dibenzo-p-dioksini („PCDD”) i Dibenzo-p-furani („PCDF”)</i>		<i>PCB-i „slični dioksinu” Ne-orto PCB-i + Mono-orto PCB-i</i>	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne-orto PCB-i	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Mono-orto PCB-i	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 118	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 123	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Korištene kratice: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = heksa; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = klordibenzo-p-dioksin; „CDF” = klordibenzofuran; „CB” = klorobifenil.

⁽²⁾ Odluka Komisije 2002/657/EZ od 14. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (SL L 221, 17.8.2002., str. 8.).

▼M4

Uz te definicije, za potrebe ovog dijela B primjenjuju se i sljedeće definicije:

„Orijentacijske metode” znači metode upotrijebljene za odabir onih uzoraka s razinama PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. One omogućavaju troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Orijetacijske metode temelje se na bioanalitičkim i GC-MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze cut-off vrijednost za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom količinom provjeravaju se punom ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrdnom metodom.

„Potvrdne metode” znači metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska kromatografija i masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Sukladnost serije ili podserije s najvećom dopuštenom količinom

2.1. U pogledu PCB-ova koji nisu slični dioksinu

Serija se prihvaća ako analitički rezultat ne prelazi najveću dopuštenu količinu za PCB-ove koji nisu slični dioksinu kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serija nije u skladu s najvećim dopuštenim količinama iz Direktive 2002/32/EZ ako gornji ⁽³⁾ analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom ⁽⁴⁾, prelazi najveće dopuštene količine uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Serija odnosno podserija nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine,
- postavljanjem granične količine (CC α) u skladu s odredbama Odluke Komisije 2002/657/EZ (točka 3.1.2.5. Priloga I. toj Odluci – primjer tvari s određenom dozvoljenom količinom). Serija ili podserija je nesukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC α .

Stavci 1., 2. i 3. primjenjuju se na rezultate analize dobivene iz uzorka za službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se nacionalni propisi.

⁽³⁾ Pojam „gornji” zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam „donji” zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam „srednji” zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.

⁽⁴⁾ Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za potvrdne metode uporabom C-obilježene unutarnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrdne metode nije sukladan. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem podrijetla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

▼M4

2.2. *U pogledu PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-ova*

Serijska je u skladu s najvećim dopuštenim količinama ako rezultat pojedinačne analize

- provedene orijentacijskom metodom s udjelom lažno sukladnih rezultata manjim od 5 % ukazuje da razina ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ,
- provedene potvrdnom metodom ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Za orijentacijske testove potrebno je odrediti cut-off vrijednost za odluku o sukladnosti s dotičnim najvećim dopuštenim količinama određenim za PCDD/PCDF ili za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova.

Serijska nije u skladu s najvećim dopuštenim količinama kako su određene u Direktivi 2002/32/EZ ako gornji ⁽⁵⁾ analitički rezultat dobiven potvrdnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom, prelazi bez sumnje najveću dopuštenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost ⁽⁶⁾. Srednja vrijednost dvaju određivanja koristi se za provjeru sukladnosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednim od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva pouzdanost od oko 95 %. Serijska odnosno podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine. U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksinu slični PCB-i, tada se koristi zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova zasebno, kako bi se dobio zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova,
- postavljanjem granične količine (CC_α) u skladu s odredbama Odluke 2002/657/EZ (točka 3.1.2.5. Priloga I. toj Odluci – primjer tvari s određenom dozvoljenom količinom. Serijska ili podserijska nije sukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC_α.

Stavci 1. do 4. primjenjuju se na rezultate analize dobivene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se nacionalni propisi.

3. **Rezultati koji prelaze pragove za pokretanje postupka kako je utvrđeno u Prilogu II. Direktivi 2002/32/EZ**

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje. Orijetacijske metode

⁽⁵⁾ Pojam „gornji” zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam „donji” zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam „srednji” zahtijeva primjenu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

⁽⁶⁾ Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostrukom analizom iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za potvrdne metode uporabom 13C-obilježenog unutarnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrdne metode nije sukladan. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem podrijetla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

▼ **M4**

uspostavljaju odgovarajuće cut-off vrijednosti za odabir tih uzoraka. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije provest će se samo ako je prelaženje praga za pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrdnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost⁽⁷⁾.

POGLAVLJE II.

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-ova u određenoj hrani**1. Područje primjene**

Zahtjevi iz ovog poglavlja primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polikloriranih dibenzop-dioksina i polikloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu i dioksinu sličnih polikloriranih bifenila (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe.

Monitoring prisutnosti PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u hrani može se obavljati pomoću dva različita tipa analitičkih metoda:

(a) Orijentacijske metode

Cilj orijentacijskih metoda je odabir onih uzoraka s razinama PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Orijentacijske metode trebale bi omogućiti troškovno učinkovitu veliku propusnost uzoraka i tako povećati mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su tako da se njima izbjegavaju lažno sukladni rezultati. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC-MS metode.

Orijentacijske metode uspoređuju analitički rezultat s cut-off vrijednošću, navodeći odluku da ili ne u pogledu mogućeg prelaženja najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima za koje se sumnja da su nesukladni s najvećom dopuštenom količinom mora biti određena/potvrđena potvrdnom metodom.

Osim toga, orijentacijske metode mogu pokazati razine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-kemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje sukladnosti ili sumnje na nesukladnost ili prelaženja pragova za pokretanje postupka i pokazuju raspon razina u slučaju daljnjeg praćenja s pomoću potvrdnih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena pragova za pokretanje postupka i najveće dopuštene količine.

(b) Potvrdne metode

⁽⁷⁾ Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješki⁽⁵⁾ za najveće dopuštene količine.

▼ **M4**

Potvrđne metode omogućuju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova u uzorku i osiguravaju punu informaciju na razini kongenera. Stoga te metode omogućuju kontrolu najvećih dopuštenih količina i pragova za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobivenih orijentacijskim metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje sukladnosti ili nesukladnosti s najvećom dopuštenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. Pozadina

Za izračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF) (vidjeti bilješku ⁽¹⁾ poglavlja I.), a zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksina sličnih spojeva izraženih kao TEQ.

Za potrebe ovog dijela B, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najniža koncentracija analita koja se može izmjeriti razumnom statističkom sigurnošću, ispunjavajući kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksina sličnih PCB-ova pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodi EPA 1613 i 1668 kako su revidirani.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

- (a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi odziv instrumenta na dva različita iona koji se prate uz omjer signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu; ili
- (b) ako zbog tehničkih razloga izračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, najniža točka koncentracije na kalibracijskoj krivulji koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičke serije uzoraka) odstupanje prosječnom faktoru relativnog odgovora izračunato za sve točke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka. LOQ se računa iz najniže točke koncentracije uzimajući u obzir povrat unutarnjih standarda i uzimanje uzorka.

Bioanalitičke orijentacijske metode ne daju rezultate na razini kongenera, već samo navode ⁽⁸⁾ vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), s obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri testiranju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.

Orijentacijske i potvrđne metode mogu se upotrijebiti za kontrolu određene matrice samo ako su dovoljno osjetljive za pouzdano utvrđivanje količina koje su na pragu za pokretanje postupka ili najvećoj dopuštenoj količini).

⁽⁸⁾ Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje spojeva kongenera uključenih u sustav TEF. Drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor aromatskih ugljikovodika (AhR) mogu biti prisutni u izolatu uzorka što pridonosi općem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena, već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

▼ M4**3. Zahtjevi za osiguranje kvalitete**

- 3.1. Mjere za sprečavanja uzajamnog zagađenja moraju se poduzeti u svakom stupnju uzorkovanja i analize.
- 3.2. Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijske, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utječu na sadržaj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika.
- 3.3. Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.
- 3.4. Gdje je to primjenjivo, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.
- 3.5. Kontrola reagensa, staklovine i opreme zbog mogućeg utjecaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opće je važnosti.
- 3.6. Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.
- 3.7. Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva staklovina i otapala koji se koriste u analizi ispitani da su slobodni od spojeva koji interferiraju s otkrivanjem ciljnih spojeva u radnom rasponu. Staklovinu treba isprati otapalima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njezine površine.
- 3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na razini najveće dopuštene količine ili pragu za pokretanje postupka.
- 3.9. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.

4. Zahtjevi za laboratorije

- 4.1. U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025.
- 4.2. Sposobnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.
- 4.3. Laboratoriji koji provode orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdne metode zbog kontrole kvalitete, i zbog potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

▼ **M4****5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF) i dioksinu slične PCB-ove****5.1. Nisko radno područje i granice kvantifikacije**

Za PCDD/PCDF, osjetljivost određivanja mora biti na razini pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih spojeva. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-ova (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog raspona mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-ova, dovoljna je razina kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

5.2.1. Potrebno je razlikovati između PCDD-a, PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova i mnogobrojnih drugih, istodobno ekstrahiranih i vjerojatno interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), nužno je razlikovati između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.

5.2.2. Bioanalitičke metode moraju moći otkriti ciljne spojeve kao zbroj PCDD/PCDF-ova i/ili dioksinu sličnih PCB-ova. Čišćenje uzorka ima za cilj uklanjanje spojeva koji uzrokuju lažnu nesukladnost rezultata ili spojeva koji mogu smanjiti odgovor i prouzročiti lažno sukladne rezultate.

5.3. Visoka točnost (istinitost i preciznost, očito iskorištenje pri biološkim testovima)

5.3.1. Kod metoda GC-MS određivanje treba osigurati valjanu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka točnost (točnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na temelju nepouzdanе procjene rezultata TEQ-a. Točnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražene kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunana iz rezultata dobivenih u uvjetima obnovljivosti).

5.3.2. Kod bionalitičkih metoda potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima. Očito iskorištenje pri biološkim testovima znači razina BEQ-a izračunata iz kalibracijske krivulje TCDD-a ili PCB-ova 126, korigirana za slijepe vrijednosti i zatim podijeljena s vrijednosti TEQ-a, koja je određena potvrđnom metodom. Njegova je namjena ispravljanje faktora poput gubitka PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih spojeva tijekom postupka ekstrakcije i pročišćavanja, povećavanje ili smanjivanje odgovora koekstrahiranih spojeva (agonistički i antagonistički učinci), kvaliteta prilagođavanja krivulje, ili razlike između vrijednosti faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF) i relativne potencije (REP). Očito iskorištenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka, koji imaju reprezentativnu raspodjelu kongenera u blizini predmetne razine.

5.4. Validacija u rasponu najveće dopuštene količine i opće mjere za kontrolu kvalitete

5.4.1. Laboratoriji moraju dokazati učinkovitost izvedbe metode u određenom rasponu najveće dopuštene količine, npr. 0,5 x, 1 x i 2 x većom količinom od najveće dopuštene količine, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tijekom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.

▼ **M4**

- 5.4.2. Redovite slijepe probe i pokusi s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni materijal) provode se kao mjere unutarnje kontrole kvalitete. Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za slijepe probe, pokuse s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je provedba analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. *Granica određivanja*

- 5.5.1. Za bioanalitičku orijentacijsku metodu, određivanje LOQ nije nužno potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepu vrijednost od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se prag izvještavanja zbog postupanja s uzorcima koji daju odgovor ispod te razine. Za prag izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim uzorcima s odgovorom ispod radnog raspona. Stoga ga se izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljne spojeve blizu najniže zahtijevane razine, a ne iz omjera između signala i šuma ili slijepe probe.

- 5.5.2. Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina najveće dopuštene količine.

5.6. *Analitički kriteriji*

Za pouzdane rezultate potvrđnih ili orijentacijskih metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji u rasponu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove:

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama	Potvrđne metode
Učestalost lažno sukladnih rezultata ⁽¹⁾	< 5 %	
Istinitost		– 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD _r)	< 20 %	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ U odnosu na najveće dopuštene količine.

5.7. *Posebni zahtjevi za orijentacijske metode*

- 5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u točki 6. Za stanične bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u točki 7.
- 5.7.2. Laboratoriji koji provode orijentacijske metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju s laboratorijima koji provode potvrdnu metodu.
- 5.7.3. Tijekom rutinske analize potrebno je provesti provjeru mogućnosti orijentacijske metode pomoću kontrole analitičke kvalitete i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora provoditi program za kontrolu sukladnih rezultata.

▼ **M4**

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja staničnog odgovora i citotoksičnosti:

20 % izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez i s dodanim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u izolatu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka s dodatkom usporedi se sa zbrojem koncentracija izolata bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25 % manja od izračunane (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i dotični rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi GC-HRMS. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

5.7.5. Kontrola kvalitete sukladnih uzoraka:

Otprilike od 2 % do 10 % sukladnih uzoraka, ovisno o matrici uzorka i laboratorijskim iskustvima, bit će potvrđeno GC-HRMS analizom.

5.7.6. Određivanje učestalosti lažno sukladnih rezultata na temelju podataka QC:

Određuje se učestalost lažno sukladnih rezultata dobivenih orijentacijskim metodama analize uzoraka ispod i iznad najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno sukladnih rezultata mora biti ispod 5 %. Kada je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/skupini matrica dostupno iz kontrole kvalitete sukladnih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno sukladnih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tijekom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2x najveće dopuštene količine (NDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su orijentacijske metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno sukladnih rezultata je najveća dopuštena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.

5.7.7. Mogući nesukladni rezultati iz orijentacijske metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno nesukladnih rezultata. Kod orijentacijskih metoda učestalost „lažnih nesukladnih rezultata” je dio rezultata za koje je potvrđeno da su sukladni potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacijskom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije sukladan. Međutim, procjena prednosti orijentacijske metode temelji se na usporedbi lažno nesukladnih rezultata s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je uporaba orijentacijske metode korisna.

5.7.8. Bioanalitičke metode moraju barem u uvjetima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunanu i izraženu kao BEQ.

I kod bioanalitičkih metoda provedenih u uvjetima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R .

▼ **M4****6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati metode GC-MS za orijentacijske ili potvrdne metode****6.1. Prihvatljive razlike između gornje i donje granice razina WHO-TEQ**

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20 % da bi se potvrdilo prelaženje najveće dopuštene količine ili u slučaju potrebe prelaženja praga za pokretanje postupka.

6.2. Kontrola iskorištenja

6.2.1. Dodavanje ^{13}C -označenih 2,3,7,8-klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF i ^{13}C -označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove je potrebno provesti na samom početku metode analize, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne skupine za dioksinima slične PCB-ove (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-ova odnosno dioksinima sličnih PCB-ova). U slučaju potvrdnih metoda koristi se svih 17 ^{13}C -označenih 2,3,7,8-klor supstituiranih unutarnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i svih 12 ^{13}C -označenih unutarnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove.

6.2.2. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ^{13}C -označen analog, tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.

6.2.3. Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadrži manje od 10 % masti, unutarnji se standardi obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udio masti veći od 10 %, unutarnji se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, što ovisi o tome dodaje li se unutarnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome iskazuju li se rezultati na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

6.2.4. Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih unutarnjih standarda mora biti u rasponu između 60 % i 120 %. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uvjetom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na temelju zbroja PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova). Za orijentacijske metode GC-MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

6.3. Uklanjanje interferirajućih tvari

— Odvajanje PCDD/PCDF-ova od interferirajućih kloriranih spojeva kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i klorirani difenil eteri se provodi pomoću odgovarajućih kromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijskim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).

— Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom mora biti zadovoljavajuće (< 25 % od vrha do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivuljom

Raspon kalibracijske krivulje mora obuhvaćati relevantni raspon najvećih dopuštenih količina ili pragova za pokretanje postupka.

▼ **M4**6.5. *Posebni zahtjevi za potvrđne metode*

— Za GC-HRMS:

U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10 % najmanjeg razmaka između dviju vršnih vrijednosti jednakog intenziteta.

Ispunjavanje daljnjih kriterija za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova s pomoću GC/HRMS i PCB indikatora pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

— Za GC-MS/MS:

Praćenje barem dvaju specifičnih prekursor iona, svakoga s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od $\pm 15\%$ za odabranu tranziciju iona produkta u usporedbi s izračunanim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeak iz kalibracijskih normi), primjenjujući identične MS/MS uvjete, posebno energiju kolizije i tlak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dostatna da dvije vršne točke razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.

Ispunjavanje daljnjih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova s pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze da se koristi GC-HRMS.

7. **Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode**

Bioanalitičke metode su metode koje se temelje na uporabi bioloških načela kao što su testovi na staničnoj osnovi, testovi na temelju receptora ili imunološki testovi. U ovoj točki 7. utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijska metoda u načelu klasificira uzorak kao sukladan ili kao sumnjiv da nije sukladan. U tu svrhu izračunana vrijednost BEQ uspoređuje se s cut-off vrijednošću (vidjeti 7.3.). Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se sukladnima, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu sukladni, što zahtijeva analizu potvrđnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 najveće dopuštene količine može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost osiguravajući učestalost lažno sukladnih rezultata ispod 5 % i prihvatljivu učestalost lažno nesukladnih rezultata. Kako su najveće dopuštene količine odvojene za PCDD/PCDF i za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, provjera sukladnosti uzoraka bez frakcioniranja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-ove kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost.

Nadalje, kod nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze prag izvješćavanja (vidjeti 7.1.1. i 7.1.6.).

▼ **M4**7.1. *Procjena odgovora na ispitivanje*7.1.1. *Opći zahtjevi*

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracijske krivulje za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krivulje pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15 %. Donji dio radnog raspona (prag izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70 % najveće učinkovite koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15 %. Radni raspon se određuje tijekom validacije. Cut-off vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.
- Standardne otopine i izolati uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardne otopine ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na temelju CV < 15 %.

7.1.2. *Kalibracija*

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivuljom

- Razine u uzorcima mogu se procijeniti usporedbom odgovora na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-ova/dioksinu sličnih PCB-ova) za izračun BEQ vrijednosti u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibracijska krivulja sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krivulje (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitetu prilagodbe krivulje u radnom rasponu. Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagodbe pri nelinearnoj regresiji. Bolja prilagodba postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krivulje (npr. smanjivanjem zbroja kvadrata rezidua).
- Procijenjena vrijednost u izolatu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunanu za slijepi uzorak matrice/otapala (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih otapala i kemikalija) i za očito iskorištenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti točku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorištenja moraju biti sukladni zahtjevima iz točke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se da se u blizini ciljne razine upotrijebi kalibracijska krivulja pripremljena iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti točku 7.2.4.): jedna slijepa matrica te tri referentna uzorka s 0,5x, 1,0x i 2,0x većom vrijednosti od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka) zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorištenja više nije potrebna. U ovom se slučaju može odgovor testa koji odgovara 2/3 najveće dopuštene količine (vidjeti 7.3.) izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak pragova za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

▼M4

7.1.3. *Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova*

Isolati se mogu podijeliti u frakcije koje sadržavaju PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-ove.

7.1.4. *Očito iskorištenje pri biološkim testovima*

„Očito iskorištenje pri biološkim testovima” izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u usporedbi s vrijednošću TEQ. Ovisno o vrsti ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF-ova ⁽⁹⁾, razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-ove mogu prouzročiti manje očito iskorištenje za dioksinu slične PCB-ove u usporedbi s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-ove 25 % do 60 %, za PCDD/PCDF-ove od 50 % do 130 % (rasponi vrijede za kalibracijsku krivulju TCDD). S obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-ova zbroju PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbroja odražava ove raspone koji iznose od 30 % do 130 %. Bilo koja implikacija bitno revidiranih vrijednosti TEF-a na zakonodavstvo Unije za PCDD/PCDF-ove i dioksinu slične PCB-ove zahtijeva reviziju ovih raspona.

7.1.5. *Kontrola iskorištenja pri čišćenju*

Gubitak spojeva tijekom čišćenja provjerava se tijekom validacije. Slijepa proba s dodatkom mješavine različitih kongenera se podvrgava čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorištenje i varijabilnost provjeravaju se potvrdnom analizom. Iskorištenje mora iznositi od 60 % do 120 % naročito za kongenere koji doprinose više od 10 % vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. *Prag izvještavanja*

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja se određuje na temelju odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na temelju kalibracijske krivulje standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krivulje. Učinci ekstrakcije i čišćenja moraju se uzeti u obzir. Prag izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. *Korištenje referentnih uzoraka*

7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.2.2. Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa matrica i jedan referentni uzorak s najvećom dopuštenom količinom ili na pragu za pokretanje postupka. Ovi uzorci se moraju ekstrahirati i analizirati istodobno u istovjetnim uvjetima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepe probe i iskorištenja.

⁽⁹⁾ Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF vrijednostima objavljenima u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223.–241. (2006.).

▼ M4

7.2.3. Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za pokusne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u pokusnim uzorcima (vidjeti točku 7.1.2.2.).

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bionalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracijskim pokusima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom 0, 0,5x, 1x i 2x najveća dopuštena količina (NDK) sa šest ponavljanja na svakoj razini ($n = 24$)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali ih se mora provjeravati u svakoj seriji ispitivanja u skladu s točkom 7.2.2.

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o sukladnosti uzorka s najvećim dopuštenim količinama ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na dotičnu najveću dopuštenu količinu ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-ove i za dioksinu slične PCB-ove ili za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova. Prikazuje ih donja krajnja točka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju $RSD_R < 25$ %. Odlučujuća granica potvrdne metode najveća je dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način (vidjeti sliku 1.).

7.3.1. Korištenje donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode:

$$\text{Cut-off vrijednost} = BEQ_{DL} - S_{y,x} * t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pri čemu je:

BEQ_{DL} BEQ što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je najveća dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost

$S_{y,x}$ standardna devijacija rezidua

$t_{\alpha, f=m-2}$ student faktor ($\alpha = 5$ %, $f =$ slobodni stupnjevi, jednostrani)

m ukupan broj kalibracijskih točaka (indeks j)

n broj ponavljanja na svakoj razini

x_i koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske točke i određena potvrdnom metodom

$\bar{x}$ srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibriranih uzoraka

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_i - \bar{x})^2$ Q_{xx} = parametar zbroja kvadrata, $i =$ indeks za kalibracijsku točku i

7.3.2. Izračun iz bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode, kao donja krajnja točka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

▼ M4

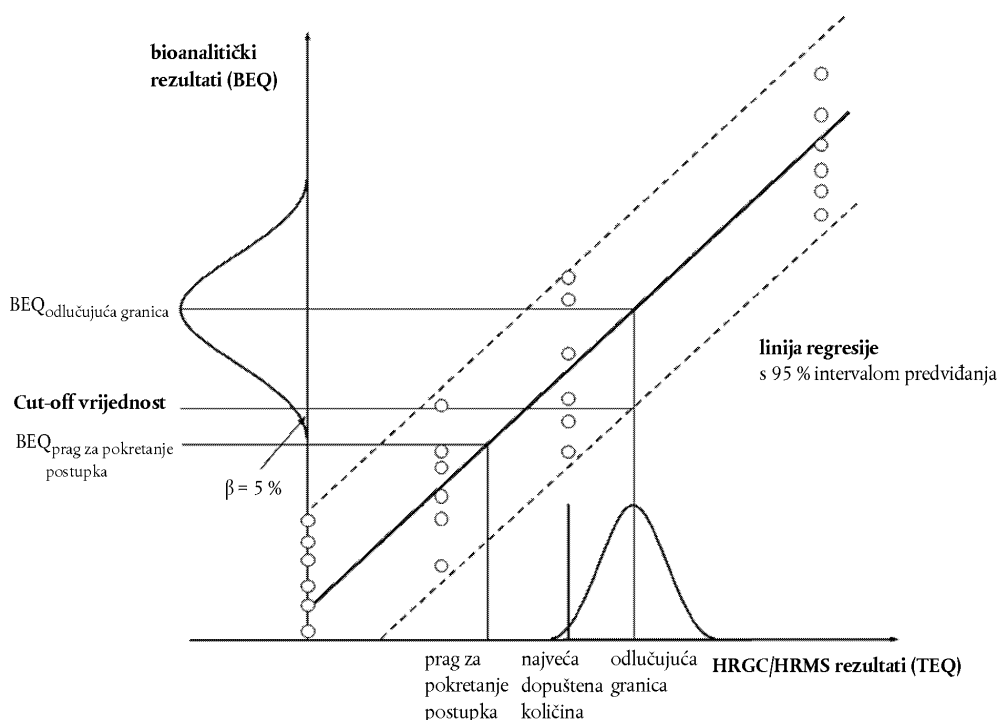
Cut-off vrijednost = $BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$

pri čemu je:

SD_R standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL} , izmjereno u uvjetima unutarnje laboratorijske obnovljivosti

- 7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ovo se temelji na zapažanju da će se ta vrijednost kretati oko cut-off vrijednosti određene u točkama 7.3.1. ili 7.3.2.

Slika 1.



Slika 1. Izračun cut-off vrijednosti na temelju 95 % razine pouzdanosti, što znači da je udio lažno sukladnih rezultata < 5 % i na temelju $RSD_R < 25 \%$:

1. iz donjeg raspona 95 % intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode;
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrđne metode kao donja krajnja točka distribucije (na slici prikazana s krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

- 7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti:

Cut-off vrijednosti na temelju BEQ, izračunane iz RSD_R postignute tijekom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim uzorcima matrice/kongenera mogu biti veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, na temelju TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobivene kada je potrebno kontrolirati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim se slučajevima cut-off vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25 \%$, ili se daje prednost dvjema trećinama najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

- 7.4. Karakteristike izvedivosti

▼ **M4**

- 7.4.1. S obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti unutarnji standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20 %, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25 %. To se temelji na razinama izračunatih u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorištenja.
- 7.4.2. U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i razine na cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti (vidjeti točku 7.1.2.).
- 7.4.3. Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.
- 7.4.4. Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunan iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolata uzorka ne smije biti iznad 15 %.
- 7.4.5. Nekorigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirano vremensko razdoblje.
- 7.4.6. Dijagrami kontrole kvalitete (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvedivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepim uzorcima u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolirati kako bi se izbjegli lažno sukladni rezultati kada se oduzimaju.
- 7.4.7. Rezultati analiza sumnjivih uzoraka dobivenih potvrdnim metodama i 2 do 10 % sukladnih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) sakuplja se i koristi za procjenu izvedivosti orijentacijske metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- 7.4.8. Uspješna izvedivost metode može se također dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2x najveće dopuštene količine, mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno sukladnih rezultata, ako laboratorij može dokazati uspješnu izvedivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.
- 7.4.9. Tijekom incidenata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. Izvještavanje o rezultatima**8.1. Potvrđne metode**

- 8.1.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-ova i kongenera dioksina sličnih PCB-ova i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.
- 8.1.2. U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksina sličnih PCB-ova.
- 8.1.3. Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6.2.5., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene količine (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.

▼ **M4**

- 8.1.4. S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksinu slični PCB-i, tada se zbroj procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koristi za zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova.
- 8.1.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom $CC\alpha$ (kako je opisano u točki 2.2. poglavlja I. ovog dijela B), tada se mora navesti i taj parametar.
- 8.1.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti barem na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Direktivi 2002/32/EZ.
- 8.2. *Bioanalitičke orijentacijske metode*
- 8.2.1. Rezultat orijentacijske metode izražava se kao sukladan ili se za njega sumnja da je nesukladan („sumnjiv”).
- 8.2.2. Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinu slične PCB-ove može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).
- 8.2.3. Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su „ispod granice izvještavanja”.
- 8.2.4. Za svaku vrstu uzorka matrice u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojoj se procjena temelji.
- 8.2.5. U izvješću se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.
- 8.2.6. U izvješću je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih PCB-ova.
- 8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu sukladni, izvješće treba uključivati napomenu o postupku koji treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbroj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

POGLAVLJE III.

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste u kontrolama količina PCB-ova koji nisu slični dioksinu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)**1. Područje primjene**

Zahtjevi postavljeni u ovom Prilogu primjenjuju se kada se hrana analizira za službenu kontrolu razina polikloriranih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-ova koji nisu slični dioksinu) i za druge regulatorne svrhe.

2. Metode detekcije koje se koriste

Plinska kromatografija/detektor hvatanja elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analita

- 3.1. Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25$ %).

▼ **M4**

- 3.2. Plinsko kromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-ova (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih tvari, posebno ko-eluiranih PCB-ova, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i nesukladnost se mora potvrditi.

[Kongeneri za koje je često ustanovljeno da ko-eluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših kloriranih kongenera.]

- 3.3. *Zahtjevi za tehnike GC-MS*

Monitoring najmanje:

- (a) dva specifična iona za HRMS;
- (b) dva specifična iona s $m/z > 200$ ili tri specifična iona s $m/z > 100$ za LRMS;
- (c) 1 prekursor ion i 2 iona produkta za MS-MS.

Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracijski standard za ciljani ion (ion s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrđnih iona:

Relativni odgovor potvrđnih iona u odnosu na ciljani ion	GC-EI-MS (relativna devijacija)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativna devijacija)
>50 %	± 10 %	± 20 %
>20 % do 50 %	± 15 %	± 25 %
>10 % do 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zadovoljavajući broj masenih fragmenata s relativnim intenzitetom > 10 % mora biti dostupan, zato uporaba potvrđnih iona s relativnim odgovorom manjim od 10 % u usporedbi s ciljnim ionom nije preporučljiva.

- 3.4. *Zahtjevi za tehnike GC-ECD*

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno odstupanje s dva stupca GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

4. **Prikazivanje izvođenja metode**

Validacija u području najveće dopuštene količine (0,5 do 2 puta više od najveće dopuštene količine) s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za srednju preciznost u točki 9.).

5. **Granica kvantifikacije**

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30 % razine kontaminacije što odgovara najvećoj dopuštenoj količini ⁽¹⁰⁾.

6. **Kontrola kvalitete**

Redovite slijepe probe, analize uzoraka s dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvalitete, sudjelovanje u međulaboratorijskim studijama s različitim matricama uzoraka.

7. **Kontrola iskorištenja**

- 7.1. Korištenje primjerenih unutarnjih standarda s fizikalno-kemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analitima.

⁽¹⁰⁾ Izrazito se preporučuje niži doprinos razine reagensa u slijepoj probi od razine kontaminanta u uzorku. Laboratorij je odgovoran kontrolirati varijaciju razina vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.

▼M4**7.2. Dodavanje unutarnjih standarda:**

Dodavanje proizvodima (prije ekstrakcije i postupka čišćenja).

7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-ova označenih izotopima:

- (a) korekcija rezultata za iskorištenje unutarnjih standarda;
- (b) iskorištenje izotopski označenih unutarnjih standarda je između 50 i 120 %;
- (c) prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom zbroju šest indikatorskih PCB-ova.

7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih unutarnjih standarda ili se koriste drugi unutarnji standardi:

- (a) kontrola iskorištenja unutarnjih standarda za svaki uzorak;
- (b) prihvatljivo iskorištenje unutarnjih standarda između 60 i 120 %;
- (c) korekcija rezultata u pogledu iskorištenja unutarnjih standarda.

7.5. Iskorištenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka s dodatkom ili kontrolnih uzoraka s koncentracijama u rasponu najveće dopuštene količine. Prihvatljivo iskorištenje za te kongenere je između 70 i 120 %.**8. Zahtjevi za laboratorije**

U skladu s odredbama Uredbe (EZ) br. 882/2004, laboratorije akreditiraju priznata tijela koja rade u skladu sa zahtjevima ISO Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025.

9. Karakteristike izvedivosti: kriteriji za zbroj šest indikatorskih PCB-ova kod najveće dopuštene količine

Istinitost	– 30 to + 30 %
Srednja preciznost (RSD %)	≤ 20 %
Razlika između izračuna gornje i donje granice	≤ 20 %

10. Izvješće o rezultatima**10.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvješće uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.****10.2. U izvješće je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-ova i masti.****10.3. Iskorištenja pojedinih unutarnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 7., u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.**

▼M4

- 10.4. S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o sukladnosti uzorka, taj je parametar također potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od 95 %.
- 10.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom $CC\alpha$ (kako je opisano u poglavlju I. točki 2.1.) tada se mora navesti i taj parametar.
- 10.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti najmanje na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Direktivi 2002/32/EZ.

▼ **M2***PRILOG VI.***METODE ANALIZE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG
PODRIJETLA ZA SLUŽBENU KONTROLU HRANE ZA ŽIVOTINJE****1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE**

Određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u hrani za životinje provodi se svjetlosnom mikroskopijom ili lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u skladu s odredbama iz ovog Priloga.

Ove dvije metode omogućuju otkrivanje prisutnosti sastojaka životinjskog podrijetla u krmivima i krmnim smjesama. Međutim, one ne omogućavaju izračun količine takvih sastojaka u krmivima i krmnim smjesama. Obje metode imaju granicu detekcije ispod 0,1 % (m/m).

PCR metoda omogućuje određivanje taksonomske skupine sastojaka životinjskog podrijetla prisutnih u krmivima i krmnim smjesama.

Ove metode primjenjuju se pri kontroli provedbe zabrana iz članka 7. stavka 1. i Priloga IV. Uredbi (EZ) br. 999/2001 i iz članka 11. stavka 1. Uredbe (EZ) br. 1069/2009.

Ovisno o vrsti hrane za životinje koja se ispituje, ove metode mogu se koristiti u okviru jednog jedinstvenog operativnog protokola bilo samostalno ili zajedno u skladu sa standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama ⁽¹⁾.

2. METODE**2.1. Svjetlosna mikroskopija****2.1.1. Načelo**

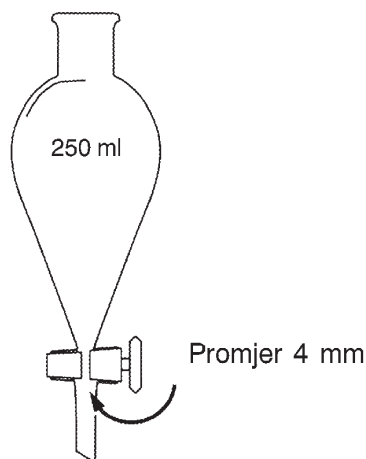
Sastojci životinjskog podrijetla koji mogu biti prisutni u krmivima i krmnim smjesama koji se šalju na analizu identificiraju se na temelju tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika kao što su mišićna vlakna i ostali dijelovi mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinje, krv, perje, ljuške jaja, riblje kosti i ljuške.

2.1.2. Reagensi i oprema**2.1.2.1. Reagensi****2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentriranje****2.1.2.1.1.1. Tetrakloretilen (gustoća 1,62)****2.1.2.1.2. Reagens za bojenje****2.1.2.1.2.1. Alizarin crvenilo (otopi se 2,5 ml 1M kloridne kiseline u 100 ml vode i toj se otopini doda 200 mg alizarin crvenila)****2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata****2.1.2.1.3.1. Lužina (NaOH 2,5 % w/v ili KOH 2,5 % w/v)**

⁽¹⁾ <http://eurl.craw.eu/>

▼ **M2**

- 2.1.2.1.3.2. Glicerol (nerazrijeđen, viskoznost: 1 490 cP)
- 2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoznost: 1 200 cP) ili smola s istovjetnim svojstvima za pripremu trajnih preparata
- 2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja
- 2.1.2.1.4.1. Lugolova otopina (otopi se 2 g kalijevog jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda)
- 2.1.2.1.4.2. Cistinski reagens (2 g olovnog acetata, 10 g NaOH/100 ml vode)
- 2.1.2.1.4.3. Fehlingov reagens (pripravi se prije uporabe od jednakih dijelova (1/1) osnovnih otopina A i B. Otopina A: 6,9 g bakrova (II) sulfata pentahidrata otopi se u 100 ml vode. Otopina B: 34,6 g kalij-natrijevog tartarata tetrahidrata i 12 g NaOH otopi se u 100 ml vode)
- 2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin/vodikov peroksid (otopi se 1 g 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml ledene octene kiseline i 150 ml vode. Prije uporabe izmiješaju se 4 dijela te TMB otopine s jednim dijelom 3 % vodikovoga peroksida)
- 2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje
- 2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (tehnički čist)
- 2.1.2.1.5.2. Aceton (tehnički čist)
- 2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje
- 2.1.2.1.6.1. Komercijalna otopina natrijevog hipoklorita (9 – 14 % aktivnog klora)
- 2.1.2.2. Oprema
- 2.1.2.2.1. Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g
- 2.1.2.2.2. Pribor za mljevenje: mlin ili mužar
- 2.1.2.2.3. Sito s mrežicom kvadratnih očica širine 0,25 mm i 1 mm
- 2.1.2.2.4. Konusni stakleni lijevak za odjeljivanje zapremine 250 ml s teflonskim čepom ili čepom od brušenog stakla na dnu konusa. Promjer otvora čepa mora biti ≥ 4 mm. Umjesto toga se može upotrijebiti čaša s konusnim dnom za taloženje pod uvjetom da je laboratorij dokazao da su granice detekcije istovjetne onima kada se koristi konusni stakleni lijevak za odjeljivanje.

Lijevak za odjeljivanje

▼ **M2**

2.1.2.2.5. Stereomikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od $6,5 \times$ do $40 \times$

2.1.2.2.6. Sastavljeni mikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od $100\times$ do $400\times$ s poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizirano svjetlo i diferencijalni interferentni kontrast

2.1.2.2.7. Standardno laboratorijsko posuđe od stakla

2.1.2.2.8. Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska stakalca, stakalca s udubinom, pokrovna stakalca (20×20 mm), pinceta, fina lopatica

2.1.3. *Uzorkovanje i priprema uzorka*

2.1.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak koji je uzet u skladu s odredbama iz Priloga I.

2.1.3.2. Mjere predostrožnosti

Kako bi se spriječila križna kontaminacija u laboratoriju, svu laboratorijsku opremu za višekratnu uporabu potrebno je pažljivo očistiti prije uporabe. Dijelove lijevka za odjeljivanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Dijelove lijevka za odjeljivanje i posude od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u perilici posuđa. Sita se moraju očistiti četkom s tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporuča se završno čišćenje sita acetonom i komprimiranim zrakom nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

2.1.3.3. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.3.1. Sušenje uzorka: uzorci sa sadržajem vlage $> 14 \%$ moraju se osušiti prije rukovanja.

2.1.3.3.2. Prethodno prosijavanje uzorka: preporuča se da se hrana u peletima i znu prethodno prosije na 1 mm, a zatim se dobivene frakcije analiziraju kao odvojeni uzorci.

2.1.3.3.3. Razdioba uzorka u poduzroke i mljevenje: barem 50 g uzorka se razdjeli na poduzorke za analizu koji se zatim melju.

2.1.3.3.4. Ekstrakcija i priprema taloga: prenese se dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odjeljivanje ili čašu s konusnim dnom za taloženje i doda se 50 ml tetrakloretilena. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3 g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog podrijetla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10 % taloga. Mješavinu je potrebno snažno protresti tijekom najmanje 30 s i mora se oprezno dodati najmanje još 50 ml tetrakloretilena kako bi se isprale unutarnje stijenke lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobivena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem čepa.

Ako se koristi čaša s konusnim dnom za taloženje, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prijanjajuće čestice uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog tetrakloretilena. Mješavinu je potrebno ostaviti stajati tijekom 3 minute i zatim ponovo promiješati tijekom 15 sekundi, a sve čestice koje prijanjaju uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog tetrakloretilena. Tako dobivena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta, zatim se tekuća frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se niti malo taloga ne izgubi.

▼ M2

Talog se osuši i zatim izvaže (s preciznošću od 0,001 g). Ako više od 5 % taloga sadrži čestice > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobivene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.5. Ekstrakcija i priprema flotata: nakon dobivanja taloga gore opisanom metodom, u lijevku za odvajanje moraju ostati dvije faze: tekuća koja se sastoji od tetrakloretilena i kruta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta kruta faza je flotat koji se izolira tako da se tetrakloretilen u cijelosti odlije iz lijevka otvaranjem čepa. Okretanjem lijevka za odvajanje, flotat se prenese u veliku Petrijevu zdjelicu i posuši na zraku u digestoru. Ako se više od 5 % flotata sastoji od čestica > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobivene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.6. Priprema sirovine: pripremi se dio od najmanje 5 g samljevenog poduzorka. Ako se više od 5 % sirovine sastoji od čestica > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobivene frakcije se ispituju.

2.1.3.4. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja

Potrebno je slijediti sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja:

- ako je mast u krutom stanju, zagrijava se u pećnici, dok ne postane tekuća,
- koristeći pipetu se prenese 40 ml masti ili ulja s dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje,
- centrifugira se 10 minuta na 4 000 okr./min,
- ako se mast skrutnula nakon centrifugiranja, zagrijava se u pećnici dok ne postane tekuća,
- ponovo se centrifugira 5 minuta na 4 000 okr./min,
- malom žličicom ili spatulom se prenese polovica dekantirane nečistoće na mikroskopsko stakalce za identifikaciju. Kao sredstvo za pripremu preparata preporuča se glicerol,
- preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u točki 2.1.3.3.

2.1.3.5. Uporaba reagensa za bojanje

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog podrijetla, subjekt može koristiti reagense za bojanje tijekom pripreme uzorka u skladu sa smjericama koje je izdao EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

Ako se koristi otopina Alizarin crvenila za bojanje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

- osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere s približno 5 ml etanola (svaki se put koristi vrtljiva miješalica tijekom 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i 30 s i zatim odlije),
- talog se izbijeli dodavanjem najmanje 1 ml otopine natrijevog hipoklorita. Reakcija se razvija 10 minuta. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi stajati 2 - 3 minute, a voda i suspendirane čestice se pažljivo odliju,

▼ **M2**

— talog se dvaput ispere s 10 ml vode (koristi se vrtložna miješalica 30 s, ostavi se istaložiti i svaki se put odlije voda),

— doda se 2 - 10 kapi otopine Alizarin crvenila i smjesa se promućka u vrtložnoj miješalici. Trajanje reakcije je 30 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere s približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki se put koristi vrtložna miješalica 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i zatim odlije),

— obojeni talog se osuši.

2.1.4. *Mikroskopski pregled*

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat se priprema od taloga i, ovisno o odabiru subjekta, od flotata ili sirovine. Ako se tijekom pripreme preparata koristilo prosijavanje, pripremaju se obje dobivene frakcije (fina i gruba). Pokusni dijelovi frakcija nanoseni na stakalca reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se osigurala provedba čitavog ispitnog protokola koji je određen u točki 2.1.4.2.

Mikroskopski preparati se pripremaju s odgovarajućim sredstvom za pripremu preparata u skladu sa SOP-om koji je odredio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim stakalcima.

2.1.4.2. Protokoli pregleda za određivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i krmivima

Pripremljeni mikroskopski preparati se pregledavaju u skladu s protokolima pregleda prikazanim u dijagramu 1 za krmne smjese i krmiva osim za čisto riblje brašno ili u dijagramu 2 za čisto riblje brašno.

Mikroskopski pregledi će se provesti koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i zavisno o odabiru subjekta bilo na flotatu ili na sirovini. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat se u potpunosti pregledava pod različitim povećanjima.

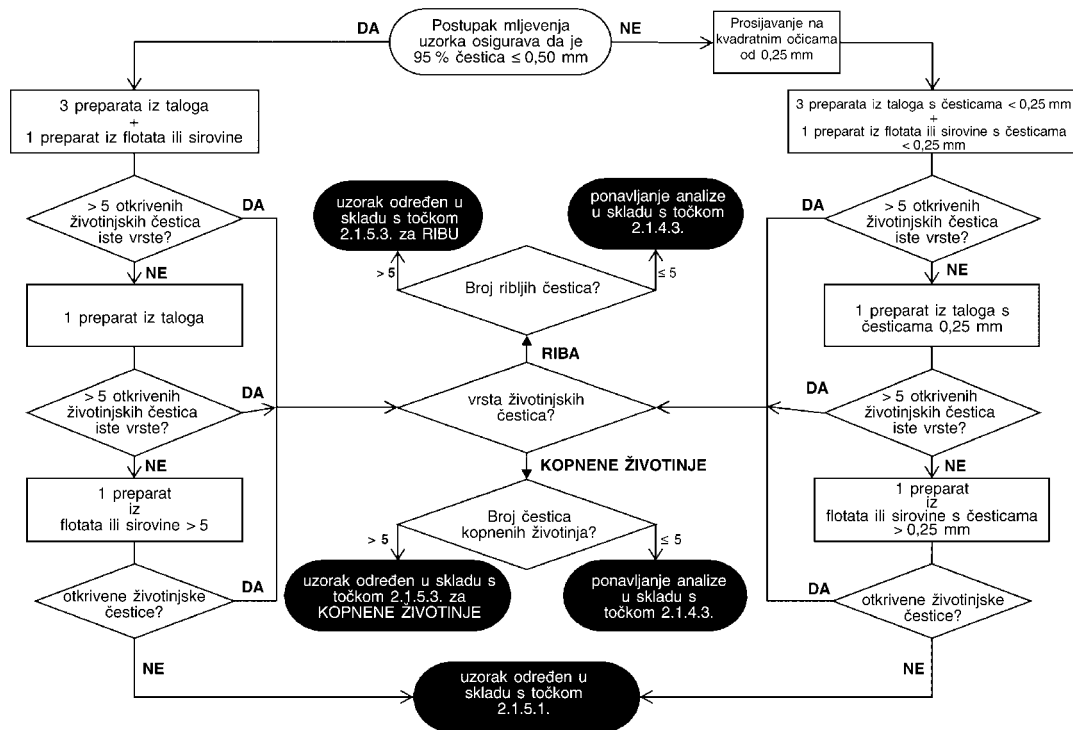
Minimalni broj preparata koji će se pregledati tijekom svakog koraka protokola pregleda mora se striktno poštovati, osim ako nije moguće korištenjem čitavog materijala iz frakcije postići utvrđeni broj preparata. Pri svakom određivanju pregledava se najviše 6 preparata.

Za lakšu identifikaciju vrste i podrijetla čestica subjekt može koristiti podupiruće alate kao što su sustavi za potporu pri odlučivanju, slikovne knjižnice i referentne uzorke.

▼ M2

Dijagram 1

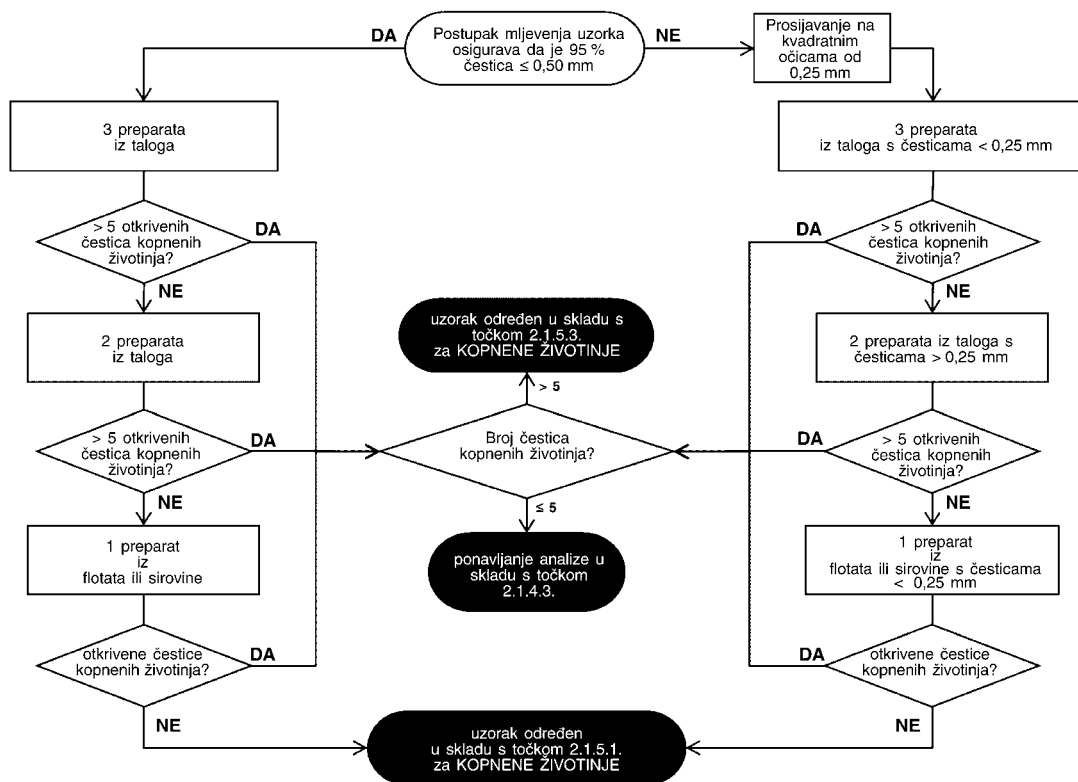
Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i krmivima osim ribljeg brašna



▼ M2

Dijagram 2

Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u ribljem brašnu



▼ **M2**

2.1.4.3. Broj određivanja

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2 nije otkrivena niti jedna životinjska čestica danog podrijetla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), nije potrebno dodatno određivanje, a o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.1.

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica danog podrijetla (tj. od kopnenih životinja ili ribe) iznosi od 1 do 5, provodi se drugo određivanje na novom poduzorku od 50 g. Ako nakon drugog određivanja ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica danog podrijetla iznosi od 0 do 5, o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.2., ili se provodi treće određivanje na novom poduzorku od 50 g. Ipak, ako je nakon prvog i drugog određivanja zbroj otkrivenih čestica danog podrijetla veći od 15, dodatno određivanje nije potrebno, a o rezultatima je potrebno izravno izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.3. Ako je nakon trećeg određivanja zbroj otkrivenih životinjskih čestica danog podrijetla veći od 15, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.2.

Ako je nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolima pregleda propisanim u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, otkriveno više od 5 životinjskih čestica danog podrijetla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem terminologije iz točke 2.1.5.3.

2.1.5. *Prikaz rezultata*

Pri izvještavanju o rezultatima, laboratorij mora navesti na kojoj vrsti materijala je provedena analiza (talog, flotat ili sirovina) i koliko je određivanja provedeno.

Laboratorijsko izvješće mora sadržavati barem informacije o prisutnosti sastojaka podrijetlom od kopnenih životinja ili ribe.

O različitim slučajevima se izvještava na sljedeće načine.

2.1.5.1. Nije otkrivena nijedna čestica danog podrijetla:

— koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica podrijetlom od kopnenih životinja,

— koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica podrijetlom od ribe.

2.1.5.2. Prosječno je otkriveno između 1 i 5 životinjskih čestica danog podrijetla:

— koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogov...] Ova niska razina prisutnosti, koja je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

▼ **M2**

Ili, ako je primjereno:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od 5 čestica podrijetlom od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge...]. Ova niska razina prisutnosti, koja je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

2.1.5.3. Prosječno je otkriveno više od 5 životinjskih čestica danog podrijetla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno je otkriveno više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi...].

Ili, ako je primjereno:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno je otkriveno više od 5 čestica podrijetlom od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge...].

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

2.2. **PCR**

2.2.1. *Načelo*

Fragmenti deoksiribonukleinske kiseline (DNK) životinjskog podrijetla koji mogu biti prisutni u krmivima i krmnim smjesama otkrivaju se tehnikom genskog umnožavanja putem PCR-a koja cilja DNK sekvence značajne za vrstu.

PCR metoda zahtijeva najprije ekstrakciju DNK-a. Umnožavanje se vrši kasnije na tako dobivenom DNK ekstraktu kako bi se otkrila ciljane životinjske vrste.

2.2.2. *Reagensi i oprema*

2.2.2.1 Reagensi

2.2.2.1.1. Reagensi za ekstrakciju DNK-a

Upotrebljavaju se samo reagensi koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

2.2.2.1.2. Reagensi za umnožavanje genskog materijala

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Početnice i sonde

Upotrebljavaju se samo početnice i sonde sa sekvencama oligonukleotida koje je validirao EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Glavna mješavina (Master mix)

Upotrebljavaju se samo otopine glavne mješavine koje ne sadrže reagense koji bi mogli prouzročiti lažne rezultate zbog prisutnosti životinjskog DNK-a ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reagensi za dekontaminaciju

2.2.2.1.2.3.1. Otopina kloridne kiseline (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Izbjeljivač (otopina natrijevog hipoklorita s 0,15 % aktivnog klora)

2.2.2.1.2.3.3. Nehrđajući reagensi za dekontaminaciju skupih uređaja kao što su analitičke vage (npr. DNA EraseTM proizvođača MP Biomedicals)

2.2.2.2. Oprema

2.2.2.2.1. Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g

2.2.2.2.2. Pribor za mljevenje

2.2.2.2.3. Uređaj za PCR (Thermocycler) koji omogućava PCR u stvarnom vremenu

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga za mikropruvete

2.2.2.2.5. Komplet mikropipeta koje omogućavaju pipetiranje od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardna plastična oprema za mikrobiologiju: mikropruvete za mikrocentrifugu, plastični nastavci s filtrima za mikropipete, odgovarajuće pločice za uređaj za PCR (thermocycler).

2.2.2.2.7. Hladnjaci za skladištenje uzoraka i reagensa

2.2.3. *Uzorkovanje i priprema uzorka*

2.2.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak uzet u skladu s odredbama iz Priloga I.

2.2.3.2. Priprema uzorka

Pri pripremi laboratorijskih uzoraka do ekstrakcije DNK-a potrebno je poštovati zahtjeve iz Priloga II. Od najmanje 50 g uzorka se napravi poduzorak za analizu, koji se zatim samelje.

Priprema uzorka mora se provesti u drugom prostoru od onih koji se koriste za ekstrakciju DNK-a i umnožavanje genskog materijala u skladu sa standardom ISO 24276.

Pripreme se dva testna uzorka od najmanje 100 mg svaki.

2.2.4. *Ekstrakcija DNK-a*

Ekstrakcija DNK-a provodi se na svakom pripremljenom testnom uzorku koristeći SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

Za svaku seriju ekstrakcije DNK-a pripremaju se dva kontrolna uzorka kako je opisano u ISO standardu 24276:

— slijepi kontrolni uzorak ekstrakcije,

— pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a.

⁽¹⁾ Popis ovih početica i sondi za svaku ciljanu životinjsku vrstu dostupan je na internetskoj stranici EURL-AP-a.

⁽²⁾ Primjeri glavnih mješavina koje su funkcionalne dostupni su na internetskoj stranici EURL-AP-a.

▼ **M2**2.2.5. *Umnožavanje genskog materijala*

Genski materijal se umnožava koristeći metode validirane za svaku vrstu koja zahtijeva identifikaciju. Te metode su propisane u SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici. Svaki ekstrakt DNK-a se analizira u najmanje dva različita razrjeđenja kako bi se ocijenila inhibicija.

Za svaku ciljanu vrstu pripremaju se dva kontrolna uzorka koja se umnažaju kako je opisano u ISO standardu 24276:

- pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR,
- kontrolni uzorak reagensa za umnožavanje (zove se također kontrolni uzorak bez matrice) se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.

2.2.6. *Tumačenje i prikaz rezultata*

U izvješću o rezultatima laboratorij mora navesti najmanje masu upotrijebljenog testnog uzorka, korištene tehnike za ekstrakciju, broj provedenih određivanja i granicu detekcije metode.

Rezultati se ne smiju tumačiti i priopćavati ako pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a i pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om ne omogućavaju određivanje ciljane vrste pri analizi, dok je rezultat kontrolnog uzorka reagensa za umnožavanje negativan.

U slučaju da rezultati dvaju testnih uzoraka nisu dosljedni, potrebno je ponoviti barem korak genskog umnožavanja. Ako laboratorij sumnja da razlog za nesukladnost mogu biti ekstrakti DNK-a, provodi se nova ekstrakcija DNK-a i umnažanje genskog materijala prije tumačenja rezultata.

Konačni prikaz rezultata mora se temeljiti na integraciji i tumačenju rezultata dvaju testnih uzoraka u skladu sa SOP-om koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

2.2.6.1. *Negativni rezultat*

O negativnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

U dostavljenom uzorku nije bio otkriven ni jedan DNK iz X (X je životinjska vrsta ili skupina životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

2.2.6.2. *Pozitivni rezultat*

O pozitivnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

DNK iz X je otkriven u dostavljenom uzorku (X je životinjska vrsta ili skupina životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).



PRILOG VII.

METODA IZRAČUNA ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANE ZA PERAD

1. Metoda izračuna i prikaza energetske vrijednosti

Energetska vrijednost hrane za perad mora se izračunati prema formuli navedenoj dalje u tekstu na temelju postotka nekih analitičkih sastojaka hrane za životinje. Ta se vrijednost iskazuje u megadžulima (MJ) metaboličke energije (ME), s korekcijama za dušik, na kilogram krmne smjese:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ sirovih bjelančevina} + 0,3431 \times \% \text{ sirovih masti} + 0,1669 \times \% \text{ škroba} + 0,1301 \times \% \text{ ukupnog šećera (iskazanog kao saharoza)}.$$

2. Odstupanja primjenjiva za navedene vrijednosti

Ako se službenom inspekcijom otkrije razlika (povećana ili smanjena energetska vrijednost hrane za životinje) između rezultata pregleda i navedene energetske vrijednosti, dopušteno je najmanje odstupanje od 0,4 MJ/kg ME.

3. Prikaz rezultata

Nakon primjene gore navedene formule dobiveni rezultat treba iskazati s jednim decimalnim mjestom.

4. Metode uzorkovanja i metode analize

Uzorkovanje krmnih smjesa i određivanje udjela analitičkih sastojaka navedenih u metodi izračuna moraju biti u skladu s metodama Zajednice za uzorkovanje ili analitičkim metodama Zajednice za službeni pregled hrane za životinje.

Primjenjuje se sljedeće:

- za određivanje udjela sirove masti: postupak B metode za određivanje sirovih ulja i masti iz dijela H Priloga III.,
- za određivanje udjela škroba: polarimetrijska metoda iz dijela L Priloga III.



PRILOG VIII.

**ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU NEPROPISNE PRISUTNOSTI
KRMNIH DODATAKA KOJI VIŠE NISU DOPUŠTENI U HRANI ZA
ŽIVOTINJE**
Važne napomene:

Za detekciju nepropisne prisutnosti krmnih dodataka koji više nisu dopušteni mogu se primjenjivati osjetljivije metode analize od analitičkih metoda navedenih u ovom Prilogu.

Za potvrdu se primjenjuju metode analize iz ovog Priloga.

A. ODREĐIVANJE METIL BENZOKVATA

*7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolon*1. **Svrha i područje primjene**

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine metil benzokvata u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. **Načelo**

Metil benzokvat se iz uzorka ekstrahira otopinom metanol metansulfonske kiseline. Ekstrakt se pročisti diklormetanom ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i zatim ponovo diklormetanom. Udio metil benzokvata određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. **Reagensi.**

3.1. Diklormetan.

3.2. Metanol, za HPLC.

3.3. Mobilna faza HPLC-a.

Smjesa metanola (točka 3.2.) i vode (za HPLC) 75 + 25 (v + v).

Filtrira se kroz filter 0,22 µm (točka 4.5.) a otopina se otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

3.4. Otopina metansulfonske kiseline, c = 2 %.

Metanolom se razrijedi 20,0 ml metansulfonske kiseline do 1 000 ml (točka 3.2.).

3.5. Otopina klorovodične kiseline, c = 10 %.

Vodom se razrijedi 100 ml klorovodične kiseline (ρ₂₀ 1,18 g/ml) do 1 000 ml.

3.6. Kationska izmjenjivačka smola Amberlite CG-120 (Na), 100 do 200 mesh.

Smola se prije uporabe obradi. Suspendira se 100 g smole u 500 ml otopine klorovodične kiseline (točka 3.5.) i uz stalno miješanje zagrijava na grijaćoj ploči do ključanja. Ohladi se i kiselina odlije. Filtrira se kroz papirni filter pod vakuumom. Smola se dvaput ispere s 500 ml vode, zatim s 250 ml metanola (točka 3.2.). Ispere se još jednom s 250 ml metanola i osuši propuhivanjem zraka kroz filtriranu pogaču. Suha se smola pohrani u zatvorenoj boci.

3.7. Standardna tvar: čisti metil benzokvat (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolon)

▼B**3.7.1. Standardna osnovna otopina metil benzokvata, 500 µg/ml**

Odvagne se 50 mg standardne tvari (točka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg, otopi u otopini metansulfonske kiseline (točka 3.4.) u odmjernoj tikvici obujma 100 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.7.2. Intermedijarna standardna otopina metil benzokvata, 50 µg/ml

Prenese se 5,0 ml osnovne standardne otopine metil benzokvata (točka 3.7.1.) u građuiranu tikvicu obujma 50 ml, dopuni do oznake metanolom (točka 3.2.) i promiješa.

3.7.3. Kalibracijske otopine

U seriju građuiranih tikvica obujma 25 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml intermedijarne standardne otopine metil benzokvata (točka 3.7.2). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.3.) i promiješa. Koncentracija metil benzokvata u tim otopinama iznosi 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 µg/ml. Prije uporabe ove se otopine moraju svježe pripremiti.

4. Oprema**4.1. Laboratorijska tresilica.****4.2. Tankoslojni rotacijski otprivač.****4.3. Staklena kolona (250 mm × 15 mm) s pipcem i spremnikom kapaciteta približno 200 ml.****4.4. Oprema za HPLC s ultralubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine, ili detektorom s nizom dioda.****4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna.****4.5. Membranski filtri, 0,22 µm.****4.6. Membranski filtri, 0,45 µm.****5. Postupak****5.1. Općenito****5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje provjerava se da nisu prisutni ni metil benzokvat niti interferentne tvari.****5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina metil benzokvata slična količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije od 15 mg/kg u 20 g slijepe probe hrane za životinje doda se 600 µl osnovne standardne otopine (točka 3.7.1.), promiješa i pričekava 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (točka 5.2.).**

Napomena: Kod ove metode slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smije pronaći metil benzokvat.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 20 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu obujma 250 ml. Doda se 100,0 ml otopine metansulfonske kiseline (točka 3.4.) i mehanički protresa (točka 4.1.) 30 minuta. Otopina se filtrira kroz papirni filter, a filtrat se spremi za postupak razdvajanja tekućina-tekućina (točka 5.3.).

5.3. Razdvajanje tekuće-tekuće

U lijevak za odjeljivanje obujma 500 ml u kojem se nalazi 100 ml otopine klorovodične kiseline (točka 3.5.) prenese se 25,0 ml filtrata dobivenog u postupku iz točke 5.2. U lijevak se doda 100 ml diklorometana (točka 3.1.) i trese jednu minutu. Pričekava se da se slojevi razdvoje te se donji (diklormetanski) sloj odlije u tikvicu s okruglim

▼B

dnom obujma 500 ml. Ponovi se ekstrakcija vodene faze s 40 ml diklorometana, a dobiveni se ekstrakti pomiješaju s prvim ekstraktom u tikvici s okruglim dnom. Ekstrakt diklorometana se otpari do suhog u rotacijskom otparivaču (točka 4.2.) pri sniženom tlaku, na 40 °C. Ostatak se otopi u 20 – 25 ml metanola (točka 3.2.), tikvica se začepi i sav ekstrakt spremi za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju (točka 5.4.).

5.4. *Ionsko-izmjenjivačka kromatografija*

5.4.1. Priprema kationske izmjenjivačke kolone

U donji dio staklene kolone postavi se mali čep od staklene vune (točka 4.3.). Pripremi se suspenzija s 5,0 g obrađene kationske izmjenjivačke smole (točka 3.6.) i 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.5.), ulije u staklenu kolonu i pričekaj da se umiri. Ukloni se višak kiseline do visine neposredno iznad površine smole, zatim se kolona ispiri vodom do neutralne reakcije eluata na lakmusov papir. U kolonu se prenese 50 ml metanola (točka 3.2.) i ostavi da istekne do površine smole.

5.4.2. Kolonska kromatografija

Dobiveni se ekstrakt (točka 5.3.) pipetom pažljivo prenese u kolonu. Tikvica s okruglim dnom se dvaput ispere s 5 – 10 ml metanola (točka 3.2.), a isprane tekućine prenesu u kolonu. Ekstrakt se ulije do površine smole i kolona ispere s 50 ml metanola, pri čemu brzina protoka ne smije prijeći 5 ml na minutu. Eluat se odbaci. Metil benzo-kvat se iz kolone eluira sa 150 ml otopine metansulfonske kiseline (točka 3.4.), a eluat iz kolone prikupi u konusnu tikvicu obujma 250 ml.

5.5. *Razdvajanje tekuće-tekuće*

Dobiveni eluat (točka 5.4.2.) prenese se u lijevak za odjeljivanje obujma 1 l. Konusna tikvica se ispere s 5 – 10 ml metanola (točka 3.2.), a isprana tekućina pomiješa sa sadržajem u lijevku za odjeljivanje. Doda se 300 ml otopine klorovodične kiseline (točka 3.5.) i 130 ml diklorometana (točka 3.1.). Trese se 1 minutu i ostavi da se faze razdvoje. Donji (diklormetanski) sloj se odlije u tikvicu s okruglim dnom obujma 500 ml. Ekstrakcija vodene faze se ponovi dvaput sa 70 ml diklorometana, a oba se ekstrakta pomiješaju s prvim u tikvici s okruglim dnom.

Ekstrakt diklorometana se otpari do suhog u rotacijskom otparivaču (točka 4.2.) pod sniženim tlakom na 40 °C. Ostatak u tikvici se otopi u približno 5 ml metanola (točka 3.2.), a otopina prenese u graduiranu tikvicu obujma 10 ml. Tikvica s okruglim dnom se dvaput ispere s 1 – 2 ml metanola, a isprane tekućine prenesu u graduiranu tikvicu. Dopuni se metanolom do oznake i promiješa. Alikvotni dio se filtrira kroz membranski filter (točka 4.6.). Ta se otopina pohrani za određivanje putem HPLC-a (točka 5.6.).

5.6. *Određivanje putem HPLC-a*

5.6.1. Parametri

Sljedeći uvjeti predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati:

- kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.),
- mobilna faza za HPLC-a: smjesa metanola i vode (točka 3.3.),
- brzina protoka: 1 – 1,5 ml/min,
- valna duljina detekcije: 265 nm,
- volumen za ubrizgavanje: 20 – 50 µl.

▼B

Stabilnost kromatografskog sustava se provjerava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine koncentracije 4,0 µg/ml (točka 3.7.3.) sve dok se ne dobiju konstantne visine ili površine vršaka i konstantna vremena retencije.

5.6.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.7.3.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.6.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (točka 5.5.), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka metil benzokvata.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti vršaka (površina) metil benzokvata iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.2.).

Udio metil benzokvata (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija metil benzokvata u otopini uzorka u µg/ml.

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Vrednovanje rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojima se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.7.3.) koncentracije 10 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

Ekstraktu uzorka se dodaje odgovarajuća količina intermedijarne standardne otopine (točka 3.7.2.). Količina dodanog metil benzokvata mora biti slična procijenjenoj količini metil benzokvata u ekstraktu uzorka.

Može se povećati samo visina vrška metil benzokvata, uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove najviše visine mora biti unutar 10 % vrijednosti prvotne širine.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;

▼B

(b) između 220 i 350 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance standardnog analita;

(c) između 220 i 350 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći: 10 % najvišeg rezultata za udio metil benzokvata između 4 i 20 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je analiza 5 uzoraka u 10 laboratorija. Svaki se uzorak analizirao dvaput.

	Slijepa proba	Brašno 1	Pelete 1	Brašno 2	Pelete 2
Srednja vrijednost	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
[mg/kg] s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Iskorištenje [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nije određeno

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

s_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

B. ODREĐIVANJE OLAKVINDOKSA

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoi]-3-metilkinoksalin- N^1, N^4 -dioksid

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine olakvindoksa u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira smjesom vode i metanola. Udio olakvindoksa određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

▼B**3. Reagensi**

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, za HPLC.

3.3. Voda, za HPLC.

3.4. Mobilna faza za HPLC.

Smjesa vode (točka 3.3) i metanola (točka 3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Standardna tvar: čisti olakvindoks 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksid, E 851.

3.5.1. Osnovna standardna otopina olakvindoksa, 250 µg/ml

Odvagne se 50 mg olakvindoksa (točka 3.5.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 200 ml, zatim se doda približno 190 ml vode. Tikvica se zatim drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.). Nakon obrade ultrazvukom, otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani u hladnjaku. Ova se otopina mora svježe pripremiti svaki mjesec.

3.5.2. Intermedijarna standardna otopina olakvindoksa, 25 µg/ml

Prenese se 10,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.5.1.) u graduiranu tikvicu obujma 100 ml, dopuni mobilnom fazom (točka 3.4.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani u hladnjaku. Ova se otopina mora svježe pripremiti svaki dan.

3.5.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica obujma 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.5.2.). Dopuni se mobilnom fazom (točka 3.4.) do oznake i promiješa. Tikvice se omotaju aluminijskom folijom. Ove otopine odgovaraju količini od 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 µg olakvindoksa na ml.

Ove se otopine moraju svježe pripremiti svaki dan.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučna kupelj

4.2. Mehanička tresilica

4.3. Oprema za HPLC s detektorom ultraljubičastog svjetla s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda

4.3.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna

4.4. Membranski filtri, 0,45 µm

5. Postupak

Napomena: Olakvindoks je osjetljiv na svjetlo. Svi se postupci izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posudu od smeđeg stakla.

5.1. *Općenito*

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje potvrđuje se da nisu prisutni niti olakvindoks niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine olakvindoksa slične količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 50 mg/kg, prenese se

▼B

10,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.5.1.) u konusnu tikvicu obujma 250 ml i otopina otpari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

Napomena: U provedbi ove metode slijepe proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost olakvindoksa.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu obujma 1 000 ml, doda 100 ml metanola (točka 3.1.) i tikvica 5 minuta drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.). Doda se 410 ml vode i ostavi daljnjih 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Tikvica se izvadi iz ultrazvučne kupelji, 30 minuta protresa u tresilici (točka 4.2.) i zatim filtrira kroz nabrani filtar. Prenese se 10,0 ml filtrata u gradiiranu tikvicu obujma 20 ml, dopuni vodom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filtar (točka 4.4.) (vidjeti točku 9. Napomena). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. Određivanje putem HPLC-a

5.3.1. Parametri:

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Analitička kolona
(točka 4.3.1.)

Mobilna faza (točka 3.4.): smjesa vode (točka 3.3.) i metanola (točka 3.2.), 900 + 100 (V + V)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Valna duljina detekcije: 380 nm

Volumen za ubrizgavanje: 20 – 100 µl

Stabilnost kromatografskog sustava se provjerava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine (točka 3.5.3.) koncentracije 2,5 µg/ml sve dok se ne dobiju konstantne visine vršaka i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.5.3.) i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (točka 5. 2.), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijsku otopinu, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka olakvindoksa.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) vršaka olakvindoksa u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.3.2.).

Udio olakvindoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼B

pri čemu je:

c = koncentracija olakvindoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.2.) u $\mu\text{g/ml}$
 m = masa pokusnog uzorka u g (točka 5.2.).

7. Vrednovanje rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.5.3.) koncentracije 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.5.3.). Količina dodanog olakvindoksa mora biti slična procijenjenoj količini olakvindoksa u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vrška olakvindoksa uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrška, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar ± 10 % početne širine vrška olakvindoksa u ekstraktu uzorka bez dodanog olakvindoksa.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) Valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.
- (b) Između 220 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanice. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanice standardnog analita.
- (c) Između 220 i 400 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanice. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanice spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 15 % najvišeg rezultata za udio olakvindoksa između 10 i 200 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 90 %.

▼B**8. Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija na razini EZ-a u kojoj se u najviše 13 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za prasid, uključujući jednu slijepu probu. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Srednja vrijednost [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Nominalni udio [mg/kg]	—	15	50	100
Iskorištenje %	—	97,3	96,0	95,4

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

S_r = standardna devijacija ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

9. Napomena

Iako ova metoda nije vrednovana za hranu za životinje koja sadrži više od 100 mg/kg olakvindoksa, mogu se dobiti zadovoljavajući rezultati uporabom manje mase uzorka i/ili razrjeđivanjem ekstrakta (točka 5.2.) tako da se dobije koncentracija u području kalibracijske krivulje (točka 5.3.2.).

C. ODREĐIVANJE AMPROLIUMA

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinijum klorid hidroklorid

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine amproliuma u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije je 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira smjesom metanola i vode. Nakon razrjeđivanja mobilnom fazom i membranske filtracije, udio amproliuma određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s izmjenom kationa uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi**3.1. Metanol.****3.2. Acetonitril, za HPLC.****3.3. Voda, za HPLC.****3.4. Otopina natrijevog dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l.**

U građuiranoj tikvici obujma 1 000 ml otopi se u vodi (točka 3.3.) 13,80 g natrijevog dihidrogen fosfat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.5. Otopina natrijevog perklorata, c = 1,6 mol/l.

U odmjernoj tikvici obujma 1 000 ml otopi se u vodi (točka 3.3.) 224,74 g natrijevog perklorat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3.) do oznake i promiješa.

▼B

- 3.6. Mobilna faza za HPLC (vidjeti napomenu pod točkom 9.1.).

Smjesa acetonitrila (točka 3.2.), otopine natrijevog dihidrogen fosfata (točka 3.4.) i otopine natrijevog perklorata (točka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Prije uporabe filtrira se membranskim filtrom 0,22 µm (točka 4.3.), a otopina se otplini (npr. najmanje 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4.)).

- 3.7. Standardna tvar: čisti amprolium, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinium klorid hidroklorid, E 750 (vidjeti napomenu pod točkom 9.2).

- 3.7.1. Osnovna standardna otopina amproliuma, 500 µg/ml

Odvagne se 50 mg amproliuma (točka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu obujma 100 ml, otopi u 80 ml metanola (točka 3.1.) i tikvicu 10 minuta drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4.). Nakon obrade ultrazvukom otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Na temperaturi ≤ 4 °C otopina je stabilna 1 mjesec.

- 3.7.2. Intermedijarna standardna otopina amproliuma, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 5,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.7.1.) u građuiranu tikvicu obujma 50 ml, dopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom (točka 3.8.) i promiješa. Na temperaturi ≤ 4 °C otopina je stabilna 1 mjesec.

- 3.7.3. Kalibracijske otopine

U seriju građuiranih tikvica obujma 50 ml prenese se 0,5, 1,0, i 2,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.7.2.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.6.) i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentraciji od 0,5, 1,0 i 2,0 µg amproliuma na ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

- 3.8. Ekstrakcijsko otapalo.

Smjesa metanola (točka 3.1.) i vode 2 + 1 (v + v)

4. Oprema

- 4.1. Oprema za HPLC sa sustavom za ubrizgavanje prikladnim za ubrizgavanje volumena od 100 µl.

- 4.1.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 125 mm × 4 mm s izmjenom kationa, punjenje Nucleosil 10 SA veličina čestica 5 ili 10 µm ili jednakovrijedno.

- 4.1.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda.

- 4.2. Membranski filter, materijal PTFE, 0,45 µm.

- 4.3. Membranski filter, 0,22 µm.

- 4.4. Ultrazvučna kupelj.

- 4.5. Mehanička tresilica ili magnetska mješalica.

5. Postupak

- 5.1. *Općenito*

- 5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Kod primjene testa iskorištenja (točka 5.1.2.) analizom slijepe probe hrane za životinje utvrđuje se da nisu prisutni niti amprolium niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju pronaći amprolium niti interferentne tvari.

▼B**5.1.2. Test iskorištenja**

Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje u koju se doda količina amproliuma slična količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 100 mg/kg, prenese se 10,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.7.1.) u konusnu tikvicu obujma 250 ml i otopina otpari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepe probe hrane za životinje slična uzorku (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se umjesto toga provesti metodom dodavanja standarda. U tom se slučaju uzorku za analizu doda količina amproliuma slična onoj u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodanog amproliuma, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija**5.2.1. Premiksi (udio amproliuma < 1 %) i hrana za životinje**

Odvagne se 5 – 40 g uzorka, ovisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,01 g, prenese u konusnu tikvicu obujma 500 ml, te se doda 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom mješalicom (točka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6.) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa (vidjeti napomenu pod točkom 9.3.). 5 – 10 ml tako razrijeđene otopine filtrira se kroz membranski filter (točka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (udio amproliuma ≥ 1 %)

Odvagne se 1 – 4 g uzorka, ovisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,001 g, prenese u konusnu tikvicu obujma 500 ml te se doda 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom mješalicom (točka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6.) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa. 5 – 10 ml tako razrijeđene otopine filtrira se kroz membranski filter (točka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. Određivanje putem HPLC**5.3.1. Parametri:**

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati.

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.1.1.):	125 mm × 4 mm, s izmjenom kationa (punjenje Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 ili 10 µm ili jednakovrijedno)
Mobilna faza (točka 3.6.):	Smjesa acetonitrila (točka 3.2.), otopine natrijevog dihidrogen fosfata (točka 3.4.) i otopine natrijevog perklorata (točka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Brzina protoka:	0,7 – 1 ml/min
Valna duljina detekcije:	264 nm
Volumen za ubrizgavanje:	100 µl

▼B

Stabilnost kromatografskog sustava se provjerava višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine (točka 3.7.3.) koncentracije 1,0 µg/ml sve dok se ne dobiju konstantne visine vršaka i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.7.3.) te se za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (točka 5.2.), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijsku otopinu, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka amproliuma.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) vršaka amproliuma u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.3.2.).

Udio amproliuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

V = volumen ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.) u ml u skladu s točkom 5.2. (tj. 200 ml)

c = koncentracija amproliuma u ekstraktu uzorka (točka 5.2.) u µg/ml

f = faktor razrjeđenja u skladu s točkom 5.2.

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Vrednovanje rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.7.3.) koncentracije 2,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.7.3.). Količina dodanog amproliuma mora biti slična procijenjenoj količini amproliuma u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vrška amproliuma uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrška, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar ± 10 % početne širine amproliuma u ekstraktu uzorka bez dodanog amproliuma.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) Valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.

▼B

(b) Između 210 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar raspona 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance standardnog analita.

(c) Između 210 i 320 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar raspona 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 15 % više vrijednosti za udio amproliuma od 25 – 500 mg/kg,

— 75 mg/kg za udio amproliuma od 500 – 1 000 mg/kg,

— 7,5 % više vrijednosti za udio amproliuma veći od 1 000 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija u kojoj se analiziralo tri uzorka hrane za perad (uzorci 1 – 3), jedan uzorak mineralne hrane za životinje (uzorak 4) i jedan uzorak premiksa (uzorak 5). Rezultati su navedeni u donjoj tablici:

	Uzorak 1 (slijepa proba hrane za životinje)	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Srednja vrijednost [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
Nominalni udio [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti

s_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

▼B**9. Napomene**

- 9.1. Ako uzorak sadrži tiamin, vršak tiamina u kromatogramu pojavljuje se malo prije vrška amproliuma. U skladu s ovom metodom, amprolium i tiamin se moraju razdvojiti. Ako se amprolium i tiamin ne razdvajaju na koloni (točka 4.1.1.) korištenoj u ovoj metodi, metanolom se zamijeni do 50 % acetonitrila u mobilnoj fazi (točka 3.6.).
- 9.2. Prema Britanskoj farmakopeji, najviše točke spektra otopine amproliuma ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) u klorovodičnoj kiselini ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) nalaze se na 246 nm i 262 nm. Apsorbanca iznosi 0,84 na 246 nm i 0,80 na 262 nm.
- 9.3. Ekstrakt se uvijek mora razrijediti mobilnom fazom, u suprotnom bi se vrijeme retencije vrha amproliuma moglo znatno pomaknuti zbog promjena ionske sile.

D. ODREĐIVANJE KARBADOKSA

Metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N^1, N^4 -dioksid

1. Svrha i područje primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine karbadoksa u hrani za životinje, premiksima i pripravcima. Granica detekcije iznosi 1 mg/kg. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se uravnoteži vodom i ekstrahira metanol-acetonitrilom. Kod hrane za životinje pročisti se alikvotni dio filtriranog ekstrakta na koloni iz aluminijevog oksida. Kod premiksa i pripravaka alikvotni se dio filtriranog ekstrakta razrijedi do primjerene koncentracije vodom, metanolom i acetonitrilom. Udio karbadoksa određuje se tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Acetonitril, za HPLC.
- 3.3. Octena kiselina, $m = 100 \%$.
- 3.4. Aluminijev oksid: neutralni, stupnja aktivnosti I.
- 3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v).

Pomiješa se 500 ml metanola (točka 3.1.) s 500 ml acetonitrila (točka 3.2.).

- 3.6. Octena kiselina, $\sigma = 10 \%$.

Vodom se razrijedi 10 ml octene kiseline (točka 3.3.) do 100 ml.

- 3.7. Natrijev acetat.

- 3.8. Voda, za HPLC.

- 3.9. Otopina acetatnog pufera, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Otopi se 0,82 g natrijevog acetata (točka 3.7.) u 700 ml vode (točka 3.8.), vrijednost pH se octenom kiselinom (točka 3.6.) podesi na 6,0. Prenese se u građuiranu tikvicu obujma 1 000 ml, dopuni vodom (točka 3.8.) do oznake i promiješa.

- 3.10. Mobilna faza za HPLC

Pomiješa se 825 ml otopine acetatnog pufera (točka 3.9.) sa 175 ml acetonitrila (točka 3.2.).

Filtrira se kroz filter 0,22 μm (točka 4.5.), a otopina otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

▼B

3.11. Standardna tvar

Čisti karbadoks: metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N¹,N⁴-dioksid,
E 850

3.11.1. Osnovna standardna otopina karbadoksa, 100 µg/ml
(vidjeti postupak pod točkom 5.):

Odvagne se 25 mg standardne tvari karbadoksa (točka 3.11.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu obujma 250 ml. Otopi se u metanol-acetonitrilu (točka 3.5.) obradom u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.7.). Nakon obrade ultrazvukom, otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (točka 3.5.) i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi ≤ 4 °C otopina je stabilna 1 mjesec.

3.11.2. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica obujma 100 ml prenese se 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.11.1.). Doda se 30 ml vode, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (točka 3.5.) i promiješa. Tikvice se omotaju aluminijskom folijom. Ove otopine odgovaraju koncentracijama karbadoksa od 2,0, 5,0, 10,0, i 20,0 µg/ml.

Kalibracijske otopine treba pripremiti svježe prije uporabe.

Napomena: Za određivanje karbadoksa u hrani za životinje koja sadrži manje od 10 mg/kg karbadoksa, moraju se pripremiti kalibracijske otopine čija je koncentracija manja od 2,0 µg/ml.

3.12. Smjesa voda-[metanol-acetonitril] (točka 3.5.), 300 + 700 (v + v)

Pomiješa se 300 ml vode sa 700 ml smjese metanola i acetonitrila (točka 3.5.).

4. **Oprema**

4.1. Laboratorijska tresilica ili magnetska mješalica.

4.2. Filtar papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili jednakovrijedan).

4.3. Staklena kolona (duljine 300 do 400 mm, unutarnji promjer približno 10 mm) sa sinteriranim staklenim filtrom i ispusnim pipcem.

Napomena: Može se koristiti i staklena kolona s pipcem ili staklena kolona s konusnim završetkom; u tom se slučaju u donji kraj umetne mali jastučić od staklene vune i staklenim štapićem potisne na dno.

4.4. Oprema za HPLC sa sustavom za ubrizgavanje primjerenim za ubrizgavanje volumena od 20 µl.

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna.

4.4.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda u području 225 do 400 nm.

4.5. Membranski filtari, 0,22 µm.

4.6. Membranski filtari, 0,45 µm.

4.7. Ultrazvučna kupelj.

▼B**5. Postupak**

Napomena: Karbadoks je osjetljiv na svjetlo. Svi se postupci izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posudu od smeđeg stakla ili u posudu omotanom aluminijskom folijom.

5.1. Općenito**5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje**

Kod primjene testa iskorištenja (točka 5.1.2.) analizom slijepe probe hrane za životinje utvrđuje se da nisu prisutni ni karbadoks niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju pronaći karbadoks niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje (točka 5.1.1.) u koju se doda količina karbadoksa slična količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 50 mg/kg, prenese se 5,0 ml osnovne standardne otopine (točka 3.11.1.) u konusnu tikvicu obujma 200 ml. Otopina se otpari do približno 0,5 ml pod strujom dušika. Doda se 10 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa i ostavi 10 minuta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se umjesto toga provesti metodom dodavanja standarda. U tom se slučaju uzorku za analizu doda količina karbadoksa slična onoj u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodanog karbadoksa, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija**5.2.1. Hrana za životinje**

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu obujma 200 ml. Doda se 15,0 ml vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 ml metanol-acetonitrila (točka 3.5), začepi i trese 30 minuta u tresilici ili miješa magnetnom mješalicom (točka 4.1.). Otopina se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (točka 4.2.). Ova se otopina pohrani za fazu pročišćavanja (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (0,1 – 2,0 %)

Odvagne se 1 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu obujma 200 ml. Doda se 15,0 ml vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 ml metanol-acetonitrila (točka 3.5.), začepi i trese 30 minuta na tresilici ili miješa magnetnom mješalicom (točka 4.1.). Otopina se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (točka 4.2.).

Alikvot filtrata se pipetom prenese u graduiranu tikvicu obujma 50 ml. Doda se 15,0 ml vode, dopuni do oznake metanol-acetonitrirom (točka 3.5.) i promiješa. Koncentracija karbadoksa u konačnoj otopini iznosi približno 10 µg/ml. Alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (točka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.4.).

5.2.3. Pripravci (> 2 %)

Odvagne se 0,2 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu obujma 250 ml. Doda se 45,0 ml vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 105,0 ml metanol-acetonitrila (točka 3.5), začepi i homogenizira. Uzorak se drži

▼B

15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.7.), zatim se 15 minuta protresa ili miješa (točka 4.1). Otopina se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (točka 4.2.).

Alikvot filtrata razrijedi se smjesom vode, metanola i acetonitrila (točka 3.12.) tako da konačna koncentracija karbadoksa iznosi 10 – 15 µg/ml (za 10 %-tni preparat faktor razrjeđenja je 10). Alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (točka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.4.).

5.3. *Pročišćivanje*

5.3.1. Priprema kolone aluminijevog oksida

Odvagne se 4 g aluminijevog oksida (točka 3.4.) i prenese u staklenu kolonu (točka 4.3.).

5.3.2. Pročišćivanje uzorka

Kroz kolonu od aluminijevog oksida propusti se 15 ml filtriranoga ekstrakta (točka 5.2.1.), a prva 2 ml eluata se odbace. Prikupi se sljedećih 5 ml, alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (točka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.4.).

5.4. *Određivanje putem HPLC-a*

5.4.1. Parametri

Sljedeći se uvjeti predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati:

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.): 300 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna

Mobilna faza (točka 3.10.): Smjesa otopine acetatnog pufera (točka 3.9.) i acetonitrila (točka 3.2.), 825 + 175 (v + v)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Valna duljina detekcije: 365 nm

Volumen za ubrizgavanje: 20 µl

Stabilnost kromatografskog sustava provjerava se višekratnim ubrizgavanjem kalibracijske otopine (točka 3.11.2.) koncentracije 5,0 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (površine) vršaka i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se ubrizga svaka kalibracijska otopina (točka 3.11.2.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) vršaka. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina vršaka kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka ((točka 5.3.2.) za hranu za životinje, (točka 5.2.2.) za premikse i (točka 5.2.3.) za pripravke) i odredi srednja vrijednost visina (površina) vršaka karbadoksa.

▼B**6. Izračun rezultata**

Koncentracija karbadoksa u otopini uzorka u $\mu\text{g/ml}$ određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) vršaka karbadoksa u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2.).

6.1. Hrana za životinje

Udio karbadoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.3.2.) u $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volumen ekstrakta u ml (tj. 50)

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi i pripravci

Udio karbadoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.2.2. ili 5.2.3.) u $\mu\text{g/ml}$

V_2 = volumen ekstrakta u ml (tj. 50 za premikse; 150 za pripravke)

f = faktor razrjeđenja u skladu s točkom 5.2.2. (premiksi) ili 5.2.3. (pripravci)

m = masa pokusnog uzorka u gramima.

7. Vrednovanje rezultata**7.1. Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.11.2.) koncentracije 10,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.11.2.). Količina dodanog karbadoksa mora biti slična procijenjenoj količini karbadoksa u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine vrška karbadoksa uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina vrška, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki vršaka kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm 2\text{ nm}$;

▼B

(b) između 225 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance standardnog analita;

(c) između 225 i 400 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke vrška i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbance. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbance spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dvaju usporednih postupaka određivanja, izvedenih na istom uzorku, za udio od 10 mg/kg i više ne smije prijeći 15 % vrijednosti višega rezultata.

7.3. Iskorištenje

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija u kojoj se u 8 laboratorija analiziralo 6 uzoraka hrane za životinje, 4 uzorka premiksa i 3 uzorka pripravka. Svaki je uzorak analiziran dvaput. (Podrobnije informacije o navedenoj međulaboratorijskoj studiji mogu se pronaći u *Journal of AOAC*, svezak 71, 1988., str. 484. – 490.) Rezultati (bez ekstremnih vrijednosti) prikazani su u donjim tablicama:

Tablica 1.

Rezultati međulaboratorijske studije za hranu za životinje

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5	Uzorak 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Srednja vrijednost (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
SR (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominalni udio (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tablica 2.

Rezultati međulaboratorijske studije za premikse i pripravke

	Premiksi				Pripravci		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Srednja vrijednost (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Premiksi				Pripravci		
	A	B	C	D	A	B	C
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominalni udio (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

Sr = standardna devijacija ponovljivosti

CVr = koeficijent varijacije ponovljivosti

SR = standardna devijacija obnovljivosti

CVR = koeficijent varijacije obnovljivosti.



PRILOG IX.

KORELACIJSKE TABLICE IZ ČLANKA 6.

1. **Direktiva 71/250/EEZ**

Direktiva 71/250/EEZ	Ova Uredba
Članak 1. prvi podstavak	Članak 3.
Članak 1. drugi podstavak	Članak 2.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	Prilog II.
Prilog, dio 2.	—
Prilog, dio 3.	—
Prilog, dio 4.	Prilog III., dio O
Prilog, dio 5.	Prilog III., dio M
Prilog, dio 6.	Prilog III., dio N
Prilog, dio 7.	Prilog III., dio Q
Prilog, dio 9.	Prilog III., dio K
Prilog, dio 10.	—
Prilog, dio 11.	—
Prilog, dio 12.	Prilog III., dio J
Prilog, dio 14.	Prilog III., dio D
Prilog, dio 16.	—

2. **Direktiva 71/393/EEZ**

Direktiva 71/393/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio I.	Prilog III., dio A
Prilog, dio II.	Prilog III., dio E
Prilog, dio III.	Prilog III., dio P
Prilog, dio IV.	Prilog III., dio H

3. **Direktiva 72/199/EEZ**

Direktiva 72/199/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog I., dio 1.	Prilog III., dio L
Prilog I., dio 2.	Prilog III., dio C
Prilog I., dio 3.	—
Prilog I., dio 4.	—
Prilog I., dio 5.	Prilog V., dio A
Prilog II.	—

4. **Direktiva 73/46/EEZ**

Direktiva 73/46/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog I., dio 1.	Prilog III., dio B
Prilog I., dio 2.	—
Prilog I., dio 3.	Prilog III., dio I

▼B**5. Direktiva 76/371/EEZ**

Direktiva 76/371/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 1.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog I.

6. Direktiva 76/372/EEZ

Direktiva 76/372/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

7. Direktiva 78/633/EEZ

Direktiva 78/633/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	—
Prilog, dio 2.	—
Prilog, dio 3.	Prilog IV., dio C

8. Direktiva 81/715/EEZ

Direktiva 81/715/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

9. Direktiva 84/425/EEZ

Direktiva 84/425/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

10. Direktiva 86/174/EEZ

Direktiva 86/174/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 4.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog VII.

11. Direktiva 93/70/EEZ

Direktiva 93/70/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog IV., dio D

▼B**12. Direktiva 93/117/EZ**

Direktiva 93/117/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	Prilog IV., dio E
Prilog, dio 2.	Prilog VIII., dio A

13. Direktiva 98/64/EZ

Direktiva 98/64/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog, dio A	Prilog III., dio F
Prilog, dio C	Prilog VIII., dio B

14. Direktiva 1999/27/EZ

Direktiva 1999/27/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Članak 6.	—
Članak 7.	—
Prilog, dio A	Prilog VIII., dio C
Prilog, dio B	Prilog IV., dio F
Prilog, dio C	Prilog VIII., dio D

15. Direktiva 1999/76/EZ

Direktiva 1999/76/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog	Prilog IV., dio G

16. Direktiva 2000/45/EZ

Direktiva 2000/45/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog, dio A	Prilog IV., dio A
Prilog, dio B	Prilog IV., dio B
Prilog, dio C	Prilog III., dio G

▼B**17. Direktiva 2002/70/EZ**

Direktiva 2002/70/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 1.
Članak 2.	Članci 2. i 3.
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Prilog I.	Prilog I. i Prilog V., dio B(I.)
Prilog II.	Prilog II. i Prilog V., dio B(II.)

18. Direktiva 2003/126/EZ

Direktiva 2003/126/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Članak 6.	—
Prilog	Prilog VI.