

Tento text slúži výlučne ako dokumentačný nástroj a nemá žiadny právny účinok. Inštitúcie Únie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah. Autentické verzie príslušných aktov vrátane ich preambúl sú tie, ktoré boli uverejnené v Úradnom vestníku Európskej únie a ktoré sú dostupné na portáli EUR-Lex. Tieto úradné znenia sú priamo dostupné prostredníctvom odkazov v tomto dokumente

► **B****NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 152/2009**

z 27. januára 2009,

ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol krmív

(Text s významom pre EHP)

(Ú. v. EÚ L 54, 26.2.2009, s. 1)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
► <u>M1</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 278/2012 z 28. marca 2012	L 91	8	29.3.2012
► <u>M2</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 51/2013 zo 16. januára 2013	L 20	33	23.1.2013
► <u>M3</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 691/2013 z 19. júla 2013	L 197	1	20.7.2013
► <u>M4</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 709/2014 z 20. júna 2014	L 188	1	27.6.2014
► <u>M5</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) 2017/645 z 5. apríla 2017	L 92	35	6.4.2017
► <u>M6</u>	Nariadenie Komisie (EÚ) 2017/771 z 3. mája 2017	L 115	22	4.5.2017
► <u>M7</u>	Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2020/1560 z 26. októbra 2020	L 357	17	27.10.2020
► <u>M8</u>	Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2022/893 zo 7. júna 2022	L 155	24	8.6.2022

▼B**NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 152/2009****z 27. januára 2009,****ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely
úradných kontrol krmív****(Text s významom pre EHP)****▼M3***Článok 1*

Odber vzoriek na účely úradných kontrol krmív, najmä pokiaľ ide o stanovenie zložiek vrátane materiálov, ktoré obsahujú geneticky modifikované organizmy alebo sa skladajú z geneticky modifikovaných organizmov (GMO), alebo sú z nich vyrobené, doplnkových látok definovaných v nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ⁽¹⁾, nežiaducich látok definovaných v smernici Európskeho parlamentu a Rady 2002/32/ES ⁽²⁾ sa vykonáva v súlade s metódami stanovenými v prílohe I.

Metóda odberu vzoriek stanovená v prílohe I je uplatniteľná na kontrolu krmív, pokiaľ ide o stanovenie rezíduí pesticídov definované v nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005 ⁽³⁾, a kontrolu súladu s nariadením (EÚ) č. 619/2011.

▼B*Článok 2*

Vzorky na analýzu sa pripravujú a výsledky sa vyjadrujú v súlade s metódami stanovenými v prílohe II.

Článok 3

Analýza na účely úradnej kontroly krmív sa vykonáva použitím metód stanovených v prílohe III (metódy analýzy na kontrolu zloženia krmných surovín a krmných zmesí), prílohe IV (metódy analýzy na účely kontroly obsahu povolených doplnkových látok), prílohe V (metódy analýzy na kontrolu nežiaducich látok v krmivách) a prílohe VI (metódy analýzy na určenie zložiek živočíšneho pôvodu na účely úradnej kontroly krmív).

Článok 4

Energetická hodnota krmnej zmesi pre hydinu sa vypočíta podľa prílohy VII.

Článok 5

Metódy analýzy na účely kontroly nelegálnej prítomnosti doplnkových látok, ktoré už nie sú povolené, stanovené v prílohe VIII, sa používajú na účely potvrdenia.

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 268, 18.10.2003, s. 29.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 140, 30.5.2002, s. 10.

⁽³⁾ Ú. v. EÚ L 70, 16.3.2005, s. 1.



Článok 6

Smernice 71/250/EHS, 71/393/EHS, 72/199/EHS, 73/46/EHS, 76/371/EHS, 76/372/EHS, 78/633/EHS, 81/715/EHS, 84/425/EHS, 86/174/EHS, 93/70/EHS, 93/117/ES, 98/64/ES, 1999/27/ES, 1999/76/ES, 2000/45/ES, 2002/70/ES a 2003/126/ES sa zrušujú.

Odkazy na tieto zrušené smernice sa považujú za odkazy na toto nariadenie a vykladajú sa v súlade s tabuľkami zhody v prílohe IX.

Článok 7

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Uplatňuje sa od 26. augusta 2009.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

▼ **M3***PRÍLOHA I***METÓDY ODBERU VZORIEK****1. ÚČEL A OBLASŤ**

Vzorky určené na úradnú kontrolu krmív sa odoberajú v súlade s metódami opísanými nižšie. Takto získané vzorky sa považujú za reprezentatívne pre vzorkované partie.

Účelom odberu reprezentatívnych vzoriek je získať malý podiel šarže tak, aby stanovenie každej konkrétnej vlastnosti tohto podielu predstavovalo priemernú hodnotu vlastnosti tejto šarže. Šarža sa vzorkuje opakovaným odberom čiastkových vzoriek z jednotlivých miest šarže. Tieto čiastkové vzorky sa spolu zmiešajú tak, aby tvorili súhrnnú vzorku, z ktorej sa reprezentatívnym delením pripraví konečné reprezentatívne vzorky.

Ak partie krmív určené na odber vzoriek preukázu pri vizuálnej kontrole kvalitatívny rozdiel oproti ostatným krmivám z rovnakej šarže, takéto partie sa oddelia od ostatného krmiva a budú sa považovať za samostatnú čiastkovú šaržu. Ak krmivo nemožno rozdeliť na samostatné čiastkové šarže, odobere sa z neho vzorka ako z jednej šarže. V takýchto prípadoch sa táto skutočnosť uvedie v správe o odbere vzoriek.

Ak sa stanovilo, že krmivo ovzorkované v súlade s ustanoveniami tohto nariadenia nezodpovedá požiadavkám EÚ a je súčasťou šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu, predpokladá sa, že toto zistenie sa týka celého množstva krmiva tejto šarže, pokiaľ z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú žiadne dôkazy o tom, že zvyšok tejto šarže nezodpovedá požiadavkám EÚ.

2. VYMEDZENIA POJMOV

- Šarža (alebo partia): je identifikovateľné množstvo krmiva, ktoré má vykazovať jednotné vlastnosti, ako sú napríklad pôvod, druh, typ balenia, baliareň, odosielateľ alebo označenie a v prípade výrobného procesu jednotka vyrobená v jednom zariadení s použitím jednotných výrobných parametrov, alebo viacero takýchto jednotiek, keď sú vyrobené v kontinuálnom poradí a skladované spolu.
- Vzorkovaná partia: šarža alebo identifikovaná časť šarže alebo čiastkovej šarže.
- Zapečatená vzorka: vzorka zapečatená tak, aby nebol možný prístup ku vzorke bez porušenia alebo bez odstránenia pečate.
- Čiastková vzorka: množstvo odobraté z jedného miesta vzorkovanej partie.
- Súhrnná vzorka: súhrn všetkých čiastkových vzoriek odobratých z tej istej vzorkovanej partie.
- Zredukovaná vzorka: časť súhrnnej vzorky získaná reprezentatívnym delením.
- Konečná vzorka: časť zredukovanej vzorky alebo zhomogenizovanej súhrnnej vzorky.
- Laboratórna vzorka: vzorka určená pre laboratórium (v podobe prijatej laboratóriom), pričom môže ísť o konečnú, zredukovanú alebo súhrnnú vzorku.

▼ **M3**

3. VŠEOBECNÉ USTANOVENIA

- Pracovníci odoberajúci vzorky: vzorky odoberajú pracovníci poverení príslušným orgánom na tento účel.
- Vzorka musí byť zapečatená tak, aby nebol možný prístup ku vzorke bez porušenia alebo bez odstránenia pečate. Značka pečate by mala byť zreteľne rozpoznateľná a jasne viditeľná. Vzorku možno prípadne umiestniť do nádoby, ktorá sa dá uzavrieť tak, aby ju nebolo možné otvoriť bez nezvratného poškodenia nádrže alebo nádoby, čím sa zabráni opätovnému použitiu tejto nádrže alebo nádoby.
- Identifikácia vzorky: vzorka musí byť nezmazateľne označená a musí sa dať identifikovať tak, aby ju bolo možné jednoznačne prepojiť so správou o odbere vzoriek.
- Z každej súhrnnej vzorky sa odoberú najmenej dve konečné vzorky: minimálne jedna vzorka je určená na kontrolu (vymáhanie práva) a jedna je pre prevádzkovateľa krmivárskeho podniku (obhajoba). Jedna konečná vzorka sa prípadne môže odobrať na referenčné účely. V prípade homogenizácie celej súhrnnej vzorky sa konečné vzorky odoberú z homogenizovanej súhrnnej vzorky, pokiaľ takýto postup nie je v rozpore s pravidlami členského štátu, pokiaľ ide o práva prevádzkovateľa krmivárskeho podniku.

4. PRÍSTROJE A POMÔCKY

- 4.1. Prístroje a pomôcky na odber vzoriek musia byť vyrobené z materiálov, ktoré nemôžu kontaminovať výrobky určené na odber vzoriek. Prístroje a pomôcky, ktoré sú určené na viacnásobné použitie, sa musia dať ľahko vyčistiť, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii.

4.2. **Odporúčané vybavenie na odber vzoriek zo suchých krmív**4.2.1. *Ručný odber vzoriek*

4.2.1.1. Lopatka s plochým dnom a vertikálnymi stranami.

4.2.1.2. Vzorkovacia tyč s dlhou dutinou alebo priehradkami. Rozmery vzorkovacej tyče musia byť primerané vlastnostiam vzorkovanej partie (hĺbka nádoby, rozmery vreca atď.) a veľkosti častíc krmív.

V prípade, že má vzorkovacia tyč niekoľko otvorov, by tieto otvory mali byť oddelené pomocou priehradiek alebo by mali byť usporiadané postupne, aby sa zabezpečilo odobratie vzorky na rôznych miestach pozdĺž tyče.

4.2.2. *Mechanický odber vzoriek*

Na odber vzoriek z krmiva v pohybe sa môže používať vhodné mechanické vybavenie. Výraz „vhodné“ znamená, že sa ovszkurje minimálne celá časť produktu v pohybe.

Odber vzoriek z krmiva v pohybe (pri vysokej prietokovej rýchlosti) možno vykonať pomocou automatických vzorkovačov.

4.2.3. *Delič vzorky*

Ak je to možné a vhodné, zariadenie určené na delenie vzorky na približne rovnaké časti by sa malo používať na prípravu zredukovaných vzoriek reprezentatívnym spôsobom.

▼ M3

5. KVANTITATÍVNE POŽIADAVKY TÝKAJÚCE SA POČTU ČIASTKOVÝCH VZORIEK

— Kvantitatívne požiadavky uvedené v bodoch 5.1 a 5.2 týkajúce sa počtu čiastkových vzoriek sa vzťahujú na veľkosť vzorkovaných partii maximálne do 500 ton, z ktorých možno odobrať vzorky reprezentatívnym spôsobom. Opísaný postup odberu vzoriek platí rovnako aj pre množstvá väčšie, ako je predpísaná maximálna veľkosť vzorkovanej partie, za predpokladu, že sa nezohľadní maximálny počet čiastkových vzoriek stanovený v nižšie uvedenej tabuľke, pričom počet čiastkových vzoriek sa stanoví podľa druhej odmocniny vzorca uvedeného v príslušnej časti postupu (pozri bod 5.3) a minimálna veľkosť súhrnnej vzorky sa úmerne zvýši. To však nebráni tomu, aby sa veľká šarža rozdelila do menších čiastkových šarží a aby sa z každej čiastkovej šarže odobrala vzorka v súlade s postupom opísaným v bodoch 5.1 a 5.2.

— Veľkosť vzorkovanej partie musí byť taká, aby v odobratej vzorke bola prítomná každá zložka krmiva.

— Pri veľmi veľkých šaržach alebo čiastkových šaržach (> 500 ton) a pri šaržach, ktoré sa prepravujú alebo skladujú spôsobom, že nie je možné odobrať vzorku v súlade s postupom odberu vzoriek uvedeným v bodoch 5.1 a 5.2 tejto kapitoly, použije sa postup odoberania vzoriek uvedený v bode 5.3.

— V prípade, že prevádzkovateľ krmivárskeho podniku je podľa právnych predpisov povinný dodržiavať toto nariadenie v rámci systému povinného monitorovania, prevádzkovateľ krmivárskeho podniku sa môže odchyliť od kvantitatívnych požiadaviek stanovených v tejto kapitole na účely zohľadnenia prevádzkových charakteristík pod podmienkou, že prevádzkovateľ krmivárskeho podniku príslušnému orgánu uspokojivo preukázal rovnocennosť postupu odberu vzoriek, pokiaľ ide o reprezentatívnosť, a po schválení zo strany príslušného orgánu.

— Ak vo výnimočných prípadoch nie je možné použiť metódu odberu vzoriek v súvislosti s kvantitatívnymi požiadavkami z dôvodu neprijateľných obchodných následkov vyplývajúcich z poškodenia šarže (v dôsledku foriem balenia, dopravných prostriedkov atď.), môže sa použiť alternatívna metóda odberu vzoriek za predpokladu, že je čo najreprezentatívnejšia a je úplne opísaná a zdokumentovaná.

5.1. Kvantitatívne požiadavky týkajúce sa čiastkových vzoriek v súvislosti s kontrolou látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmive

5.1.1. Volné ložené suché krmivá

Veľkosť vzorkovanej partie	Minimálny počet čiastkových vzoriek
≤ 2,5 tony	7
> 2,5 tony	√ 20-násobok počtu ton, ktoré tvoria vzorkovanú partiu (*), až do 40 čiastkových vzoriek

(*) Ak je získaný počet vyjadrený zlomkom, zaokrúhli sa na najbližšie vyššie celé číslo.

▼ M3

5.1.2. *Voľné ložené tekuté krmivá*

Veľkosť vzorkovanej partie	Minimálny počet čiastkových vzoriek
≤ 2,5 tony alebo ≤ 2 500 litrov	4 (*)
> 2,5 tony alebo > 2 500 litrov	7 (*)

(*) V prípade, že nie je možné kvapalinu homogenizovať, počet čiastkových vzoriek sa musí zvýšiť.

5.1.3. *Balené krmivo*

Krmivo (pevné a tekuté) môže byť balené vo vreckách, vrecúškach, plechovkách, nádobách atď., ktoré sú v tabuľke uvedené ako jednotky. Z veľkých jednotiek (≥ 500 kg alebo litrov) sa odber vzoriek musí vykonávať v súlade s ustanoveniami určenými pre voľné ložené krmivá (pozri oddiel 5.1.1 a 5.1.2).

Veľkosť vzorkovanej partie	Minimálny počet jednotiek, z ktorých sa musí odobrať (aspoň) jedna čiastková vzorka (*)
1 až 20 jednotiek	1 jednotka (**)
21 až 150 jednotiek	3 jednotky (**)
151 až 400 jednotiek	5 jednotiek (**)
> 400 jednotiek	$\frac{1}{4} \sqrt{\text{počet jednotiek, ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (***)}}$, až do 40 jednotiek

(*) V prípade, keď otvorenie jednotky môže ovplyvniť analýzu (napr. kaziace sa vlhké krmivo), čiastkovou vzorkou musí byť neotvorená jednotka.

(**) V prípade jednotiek, ktorých obsah nepresahuje 1 kg alebo jeden liter, čiastkovou vzorkou je obsah jednej pôvodnej jednotky.

(***) Ak je získaný počet vyjadrený zlomkom, zaokrúhli sa na najbližšie vyššie celé číslo.

5.1.4. *Bloky krmiva a minerálne lizy*

Odoberie sa minimálne jeden blok alebo jeden liz na vzorkovanú partiu s počtom 25 jednotiek, najviac však štyri bloky alebo štyri lizy.

V prípade blokov alebo lizov s hmotnosťou najviac 1 kg sa za čiastkovú vzorku považuje obsah jedného bloku alebo jedného lizu.

5.1.5. *Objemové krmivá/krmoviny*

Veľkosť vzorkovanej partie	Minimálny počet čiastkových vzoriek (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	$\sqrt[3]{5 \cdot \text{násobok počtu ton, ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (**)}}}$, až do 40 čiastkových vzoriek

(*) Je známe, že v niektorých situáciách (napr. pri siláži) nie je možné odobrať požadované čiastkové vzorky bez toho, aby došlo k neprijateľnému poškodeniu šarže. V takýchto situáciách možno použiť alternatívnu metódu odberu vzorky a pokyny na odber vzorky z takýchto šarží sa vypracujú do nadobudnutia účinnosti tohto nariadenia.

(**) Ak je získaný počet vyjadrený zlomkom, zaokrúhli sa na najbližšie vyššie celé číslo.

▼ M3**5.2. Kvantitatívne požiadavky týkajúce sa čiastkových vzoriek v súvislosti s kontrolou zložiek alebo látok, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v krmive**

Tieto kvantitatívne požiadavky týkajúce sa čiastkových vzoriek sa uplatňujú v týchto situáciách:

— kontrola aflatoxínov, ražného námelu, mykotoxínov a škodlivých botanických nečistôt v kŕmnych surovinách,

— kontrola krížovej kontaminácie niektorou zo zložiek vrátane geneticky modifikovaného materiálu alebo látkou, v prípade ktorej sa v kŕmnych surovinách predpokladá nerovnomerné rozloženie.

V prípade, že má kontrolný orgán silné podozrenie na takéto nerovnomerné rozloženie aj v prípade krížovej kontaminácie niektorou zo zložiek alebo látkou v kŕmnej zmesi, môžu sa uplatniť kvantitatívne požiadavky stanovené v nižšie uvedenej tabuľke.

Veľkosť vzorkovanej partie	Minimálny počet čiastkových vzoriek
< 80 ton	Pozri kvantitatívne požiadavky v bode 5.1. Počet čiastkových vzoriek, ktoré sa musia odobrať, sa musí vynásobiť koeficientom 2,5.
≥ 80 ton	100

5.3. Kvantitatívne požiadavky týkajúce sa čiastkových vzoriek v prípade veľkých šarží

V prípade veľkých vzorkovaných partií (vzorkované partie > 500 ton) sa musí odobrať počet čiastkových vzoriek = 40 čiastkových vzoriek + $\sqrt{\text{ton}}$ v súvislosti s kontrolou látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmive alebo 100 čiastkových vzoriek + $\sqrt{\text{ton}}$ v súvislosti s kontrolou zložiek alebo látok, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v kŕmnych surovinách.

6. KVANTITATÍVNE POŽIADAVKY TÝKAJÚCE SA SÚHRNNEJ VZORKY

Vyžaduje sa jedna súhrnná vzorka na vzorkovanú partiu.

	Charakter krmiva	Minimálna veľkosť súhrnnej vzorky (*) (**) (***)
6.1.	Voľne ložené krmivá	4 kg
6.2.	Balené krmivá:	4 kg (***)

▼ M3

Vyžaduje sa jedna súhrnná vzorka na vzorkovanú partiu.

	Charakter krmiva	Minimálna veľkosť súhrnnej vzorky (*) (**)
6.3.	Tekuté alebo polotekuté krmivá:	4 litre
6.4.	Bloky krmiva a minerálne lizy:	
6.4.1.	Každý s hmotnosťou viac ako 1 kg	4 kg
6.4.2.	Každý s hmotnosťou do 1 kg	Hmotnosť štyroch pôvodných blokov alebo lizov
6.5.	Objemové krmivo/krmoviny	4 kg (****)

(*) V prípade, že má vzorkované krmivo vysokú cenu, možno odobrať menšie množstvo súhrnnej vzorky pod podmienkou, že bude opísané a zdokumentované v správe o odbere vzoriek.

(**) V súlade s ustanoveniami nariadenia Komisie (EÚ) č. 619/2011 z 24. júna 2011, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradnej kontroly krmív, pokiaľ ide o prítomnosť geneticky modifikovaného materiálu, v prípade ktorého prebieha povoľovacie konanie alebo povolenie ktorého vypršalo (Ú. v. EÚ L 166, 25.6.2011, s. 9), musí súhrnná vzorka na kontrolu prítomnosti geneticky modifikovaného materiálu obsahovať aspoň 35 000 semien/zŕn. To znamená, že v prípade kukurice musí byť veľkosť súhrnnej vzorky aspoň 10,5 kg a v prípade sóje 7 kg. U ostatných semien a zŕn, ako sú jačmeň, proso, ovos, ryža, raž, pšenica a semeno repky olejnej zodpovedá veľkosť súhrnnej vzorky vážiacej 4 kg viac ako 35 000 semenám.

(***) V prípade baleného krmiva nemusí byť možné dosiahnuť pri súhrnnej vzorke veľkosť 4 kg v závislosti od veľkosti jednotlivých jednotiek.

(****) V prípade, že ide o objemové krmivo alebo krmoviny s nízkou špecifickou hmotnosťou (napr. seno, slama), súhrnná vzorka by mala mať veľkosť minimálne 1 kg.

7. KVANTITATÍVNE POŽIADAVKY TÝKAJÚCE SA KONEČNÝCH VZORIEK

Konečné vzorky

Vyžaduje sa analýza aspoň jednej konečnej vzorky. Množstvo konečnej vzorky na analýzu nie je menšie ako:

Suché krmivá	500 g (*) (**) (***)
Tekuté alebo polotekuté krmivá	500 ml (*)

(*) V súlade s ustanoveniami nariadenia Komisie (EÚ) č. 619/2011 musí konečná vzorka na kontrolu prítomnosti geneticky modifikovaného materiálu obsahovať minimálne 10 000 semien/zŕn. To znamená, že v prípade kukurice musí byť veľkosť konečnej vzorky aspoň 3 000 g a v prípade sójových bôbov 2 000 g. U ostatných semien a zŕn, ako sú jačmeň, proso, ovos, ryža, raž, pšenica a semeno repky olejnej zodpovedá veľkosť konečnej vzorky 500 g viac ako 10 000 semenám.

(**) V prípade, že veľkosť súhrnnej vzorky je výrazne menšia ako 4 kg alebo litre (pozri poznámku pod čiarou k bodu 6), možno odobrať aj menšie množstvo konečnej vzorky pod podmienkou, že sa opíše a zdokumentuje v správe o odbere vzoriek.

(***) V prípade odberu vzoriek zo strukovín, obilných zŕn a orechov na stanovenie reziduí pesticídov musí byť minimálna veľkosť konečnej vzorky 1 kg v súlade s ustanoveniami smernice Komisie 2002/63/ES (Ú. v. ES L 187, 16.7.2002, s. 30).

▼ M3

8. METÓDA ODBERU VZORIEK PRE VEĽMI VEĽKÉ ŠARŽE ALEBO ŠARŽE USKLADNENÉ ALEBO PREPRAVOVANÉ SPÔSOBOM, PRI KTOROM NIE JE MOŽNÝ ODBER VZORKY Z CELEJ ŠARŽE

8.1. **Všeobecné zásady**

V prípade, že spôsob prepravy alebo skladovania šarže neumožňuje odobrať čiastkové vzorky z celej šarže, odber vzoriek z takýchto šarží by sa mal prednostne uskutočniť, keď je šarža v pohybe.

V prípade veľkých skladov určených na skladovanie krmiva by prevádzkovatelia mali byť nabádaní k tomu, aby v sklade nainštalovali zariadenie, ktoré umožní (automatický) odber vzoriek z celej uloženej šarže.

V prípade používania postupov odberu vzoriek stanovených v kapitole 8 bude prevádzkovateľ krmivárskeho podniku alebo jeho zástupca informovaný o postupe odberu vzoriek. V prípade, že prevádzkovateľ krmivárskeho podniku alebo jeho zástupca tento postup odberu vzoriek spochybní, prevádzkovateľ krmivárskeho podniku alebo jeho zástupca umožní príslušnému orgánu odobrať vzorku z celej šarže na svoje náklady.

8.2. **Veľké šarže prepravované loďou**

8.2.1. *Dynamický odber vzoriek z veľkých šarží prepravovaných loďou*

Odber vzoriek z veľkých šarží na lodiach sa prednostne vykonáva, keď je produkt v pohybe (dynamický odber vzoriek).

Odber vzoriek sa má uskutočňovať podľa jednotlivých buniek (jednotky nákladného priestoru, ktoré možno fyzicky oddeliť). Bunky sa však vyprázdňujú po častiach jedna po druhej, takže pôvodné fyzické oddelenie už po preprave do skladovacích zariadení neexistuje. Odber vzoriek preto možno uskutočniť na základe pôvodného fyzického oddelenia alebo na základe oddelenia po preprave do skladovacích zariadení.

Vykládka lode môže trvať niekoľko dní. Odber vzoriek sa spravidla musí vykonávať v pravidelných intervaloch počas celého trvania vykládky. Nie je však vždy možné ani vhodné, aby bol pri odbere vzoriek počas celej vykládky prítomný úradný inšpektor. Z toho dôvodu je možné ovzorkovať len časť celej šarže (vzorkovaná partia). Počet čiastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie.

V prípade, že sa vzorky odoberajú z časti šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu a že sa zistilo, že táto časť šarže nespĺňa požiadavky EÚ, má sa za to, že sa to týka všetkého krmiva tejto šarže, pokiaľ sa z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú dôkazy o tom, že zvyšok šarže nie je v súlade s požiadavkami EÚ.

Prítomnosť inšpektora je nevyhnutná aj vtedy, keď sa úradná vzorka odberá automaticky. V prípade, že sa automatický odber vzoriek vykonáva podľa vopred stanovených parametrov, ktoré počas odberu vzoriek nie je možné zmeniť, a čiastkové vzorky sa zhromažďujú v zapečatenej nádobe, aby sa predišlo prípadnému podvodu, prítomnosť inšpektora je potrebná len na začiatku odberu vzoriek, pri každej výmene nádoby so vzorkami a na konci odberu vzoriek.

▼ **M3****8.2.2. *Odber vzoriek zo šarží prepravovaných loďou prostredníctvom statického odberu vzoriek***

V prípade, že sa odber vzoriek vykonáva staticky, musí sa použiť rovnaký postup ako pre skladovacie zariadenia (silá) prístupné zhora (pozri bod 8.4.1).

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti (zhora) šarže/bunky. Počet čiastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie. V prípade, že sa vzorky odoberajú z časti šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu a že sa zistilo, že táto časť šarže nespĺňa požiadavky EÚ, má sa za to, že sa to týka všetkého krmiva tejto šarže, pokiaľ sa z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú dôkazy o tom, že zvyšok šarže nie je v súlade s požiadavkami EÚ.

8.3. *Odber vzoriek z veľkých šarží uložených v skladoch*

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti šarže. Počet čiastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie. V prípade, že sa vzorky odoberajú z časti šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu a že sa zistilo, že táto časť šarže nespĺňa požiadavky EÚ, má sa za to, že sa to týka všetkého krmiva tejto šarže, pokiaľ sa z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú dôkazy o tom, že zvyšok šarže nie je v súlade s požiadavkami EÚ.

8.4. *Odber vzoriek zo skladovacích zariadení (sil)***8.4.1. *Odber vzoriek zo sil (lahko) prístupných zhora***

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti šarže. Počet čiastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie. V prípade, že sa vzorky odoberajú z časti šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu a že sa zistilo, že táto časť šarže nespĺňa požiadavky EÚ, má sa za to, že sa to týka všetkého krmiva tejto šarže, pokiaľ sa z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú dôkazy o tom, že zvyšok šarže nie je v súlade s požiadavkami EÚ.

8.4.2. *Odber vzoriek zo sil, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá)***8.4.2.1. *Silá, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá) s veľkosťou > 100 ton***

Z krmiva skladovaného v takýchto silách sa nemôžu odoberať vzorky statickým spôsobom. Preto v prípade, keď sa musí odobrať vzorka krmiva v sile a keď neexistuje žiadna možnosť presunutia zásielky, musí sa s prevádzkovateľom uzatvoriť dohoda o tom, že bude inšpektora informovať o vyprázdnení sily s cieľom umožniť odber vzorky z krmiva v pohybe.

8.4.2.2. *Silá, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá) s veľkosťou < 100 ton*

Pri odbere vzoriek sa do nádoby vypustí 50 až 100 kg, z ktorých sa odoberie vzorka. Veľkosť súhrnnej vzorky zodpovedá celej šarži a počet čiastkových vzoriek súvisí s počtom sil vypustených do nádoby na odber vzorky. V prípade, že sa vzorky odoberajú z časti šarže krmiva rovnakej triedy alebo rovnakého opisu a že sa zistilo, že táto časť šarže nespĺňa požiadavky EÚ, má sa za to, že sa to týka všetkého krmiva tejto šarže, pokiaľ sa z podrobného posúdenia nevyplynie, že neexistujú dôkazy o tom, že zvyšok šarže nie je v súlade s požiadavkami EÚ.

▼ **M3****8.5. Odber vzoriek z voľne ložených krmív vo veľkých uzavretých kontajneroch**

Z takýchto šarží možno často odobrať vzorky len pri vykládke. V niektorých prípadoch nie je vykládka v čase dovozu alebo kontroly možná, a preto by sa mala vzorka odobrať pri vykladaní takýchto kontajnerov.

9. POKYNY PRE ODBER, PRÍPRAVU A BALENIE VZORIEK**9.1. Všeobecné pokyny**

Vzorky sa musia odoberať a pripraviť bez zbytočného odkladu s ohľadom na preventívne opatrenia, ktoré sú potrebné na zabezpečenie toho, aby nedošlo k zámene ani ku kontaminácii produktu. Nástroje, ako aj plochy a nádoby určené na príjem vzoriek musia byť čisté a suché.

9.2. Čiastkové vzorky

Čiastkové vzorky sa musia odobrať náhodne z celej vzorkovanej partie a musia mať približne rovnakú veľkosť.

Veľkosť čiastkovej vzorky je najmenej 100 gramov alebo 25 gramov v prípade objemového krmiva alebo krmovín s nízkou špecifickou hmotnosťou.

V prípade, že podľa pravidiel týkajúcich sa postupu odberu vzoriek stanovených v bode 8 sa musí odobrať menej ako 40 čiastkových vzoriek, veľkosť čiastkových vzoriek sa stanoví na základe požadovanej veľkosti súhrnnej vzorky, ktorá sa má dosiahnuť (pozri bod 6).

V prípade odberu vzoriek z malých šarží baleného krmiva, z ktorých sa podľa kvantitatívnych požiadaviek musí odobrať obmedzený počet čiastkových vzoriek, čiastkovou vzorkou je obsah jednej pôvodnej jednotky, ktorej obsah nepresahuje 1 kg alebo jeden liter.

V prípade odberu vzoriek z balených krmív, ktoré tvoria malé jednotky (napr. < 250 g), závisí veľkosť čiastkovej vzorky od veľkosti jednotky.

9.2.1. Voľne ložené krmivá

Odber vzorky sa môže v prípade potreby vykonať počas pohybu vzorkovanej partie (nakladanie alebo vykládanie).

9.2.2. Balené krmivo

Po výbere požadovaného počtu jednotiek na odber vzoriek podľa kapitoly 5 sa časť obsahu každej jednotky odoberá pomocou tyče alebo lopaty. V prípade potreby sa vzorky odoberú oddelene po vyprázdnení jednotiek.

9.2.3. Homogénne alebo homogenizovateľné tekuté alebo polotekuté krmivá

Po výbere požadovaného počtu jednotiek na odber vzoriek podľa kapitoly 5 sa obsah v prípade potreby homogenizuje a z každej jednotky sa odoberie určité množstvo.

Čiastkové vzorky môžu byť odobraté počas vyprázdňovania obsahu jednotky.

▼ **M3****9.2.4. Nehomogenizovateľné, tekuté alebo polotekuté krmivá**

Po výbere požadovaného počtu jednotiek na odber vzoriek podľa kapitoly 5 sa odoberú vzorky z rôznych vrstiev.

Vzorky môžu byť odobraté aj počas vyprázdňovania obsahu, ale prvé frakcie treba odstrániť.

V každom prípade celkový odobratý objem nesmie byť menší ako 10 litrov.

9.2.5. Bloky krmiva a minerálne lizy

Po výbere požadovaného počtu blokov alebo lizov na odber vzoriek podľa kapitoly 5 sa odoberie časť z každého bloku alebo lizu. V prípade podozrenia na nehomogenizovaný blok alebo liz sa ako vzorka môže odobrať celý blok alebo liz.

V prípade blokov alebo lizov s hmotnosťou najviac 1 kg sa za čiastkovú vzorku považuje obsah jedného bloku alebo jedného lizu.

9.3. Príprava súhrnných vzoriek

Čiastkové vzorky sa zmiešajú tak, aby vytvorili jednu súhrnnú vzorku.

9.4. Príprava konečných vzoriek

Súhrnná vzorka sa má dôkladne premiešať ⁽¹⁾.

— Každá vzorka sa vloží do vhodnej nádoby/obalu. Urobia sa všetky potrebné preventívne opatrenia, aby počas prepravy alebo skladovania nedošlo k zmene zloženia vzorky, jej kontaminácii alebo znehodnoteniu.

— V prípade kontroly zložiek alebo látok rovnomerne rozložených v krmive možno súhrnnú vzorku reprezentatívne zredukovať na vzorku s hmotnosťou najmenej 2 kg alebo objemom najmenej 2 litre (zredukovaná vzorka) ⁽²⁾, a to podľa možnosti pomocou mechanického alebo automatického deliča. Pri kontrole prítomnosti rezíduí pesticídov v strukovinách, obilných zrnách a orechoch je minimálna veľkosť zredukovanej vzorky 3 kg. V prípade, že charakter krmiva neumožňuje použiť delič alebo v prípade, že delič nie je k dispozícii, možno vzorku zredukovať metódou štvrtenia. Zo zredukovaných vzoriek sa pripraví konečné vzorky (na účel kontroly, obhajoby a referencie), a to približne v rovnakom množstve a v súlade s kvantitatívnymi požiadavkami stanovenými v kapitole 7. V prípade kontroly zložiek vrátane geneticky modifikovaného materiálu alebo látok, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v krmive, súhrnná vzorka musí byť:

— úplne homogenizovaná a následne rozdelená do konečných vzoriek, alebo

— zredukovaná najmenej na 2 kg alebo 2 litre ⁽³⁾ pomocou mechanického alebo automatického deliča. Iba v prípade, keď charakter krmiva neumožňuje použiť delič, možno túto vzorku v prípade potreby zredukovať metódou štvrtenia. Na kontrolu prítomnosti geneticky modifikovaného materiálu v rámci nariadenia (EÚ) č. 619/2011 musí zredukovaná vzorka obsahovať najmenej 35 000 semien/zrn, aby bolo možné získať konečné vzorky na účely kontroly, obrany a referencie pri najmenej 10 000 semenách/zrnách (pozri poznámku pod čiarou ^(**) v kapitole 6 a poznámku pod čiarou ^(*) v kapitole 7).

⁽¹⁾ Hrudky sa rozbijú (v prípade potreby sa najskôr oddelia a neskôr vrátia do vzorky).

⁽²⁾ S výnimkou prípadov objemového krmiva alebo krmovín s nízkou špecifickou hmotnosťou.

⁽³⁾ S výnimkou prípadov objemového krmiva alebo krmovín s nízkou špecifickou hmotnosťou.

▼ M3**9.5. Balenie vzoriek**

Nádoby alebo balenia sa zapečatia a označia tak, aby ich nebolo možné otvoriť bez porušenia pečate. Celé označenie musí byť neoddeliteľnou súčasťou pečate.

9.6. Zasielanie vzoriek do laboratória

Vzorka sa bez zbytočného odkladu zašle do určeného analytického laboratória spolu s informáciami, ktoré analytik potrebuje.

10. ZÁZNAM O ODBERE VZORKY

Z každého odberu vzorky sa musí vypracovať záznam umožňujúci jednoznačnú identifikáciu každej vzorkovanej partie a jej veľkosti.

Tento záznam musí taktiež zahŕňať všetky odchýlky od postupu odberu vzoriek stanoveného v tomto nariadení.

Okrem sprístupnenia záznamu úradnému kontrolnému laboratóriu sa záznam sprístupní prevádzkovateľovi krmivárskeho podniku a/alebo laboratóriu určenému prevádzkovateľom krmivárskeho podniku.

▼ **M3***PRÍLOHA II***VŠEOBECNÉ USTANOVENIA TÝKAJÚCE SA ANALYTICKÝCH
METÓD PRE KRMIVÁ****A. PRÍPRAVA VZORIEK NA ANALÝZU****1. Účel**

Postupy opísané nižšie sa týkajú prípravy na analýzu vzoriek zasielaných kontrolným laboratóriám po odobratí vzoriek v súlade s ustanoveniami stanovenými v prílohe I.

Laboratórne vzorky musia byť pripravené tak, aby navážené množstvá, ktoré sú uvedené v analytických metódach, boli homogénne a reprezentatívne pre konečné vzorky.

2. Preventívne opatrenia, ktoré sa majú prijať

Postup prípravy vzorky, ktorý sa má dodržiavať, závisí od metód analýzy, ktoré majú byť použité, a od zložiek alebo látok, ktoré sa majú kontrolovať. Preto je mimoriadne dôležité zabezpečiť, aby bol tento postup prípravy vzorky primeraný použitej analytickej metóde a zložkám alebo látkam, ktoré sa majú kontrolovať.

Všetky potrebné kroky pracovného postupu sa musia vykonať takým spôsobom, aby sa v čo najvyššej možnej miere zamedzilo kontaminácii vzorky a zmenám jej zloženia.

Mletie, premiešanie a preosievanie by sa malo vykonať bez zbytočného odkladu s minimálnym vystavením vzorky účinkom vzduchu a svetla. Nemali by sa používať mlynčeky a drviče, ktoré by mohli vzorky značne zahrievať.

Ručné mletie sa odporúča v prípade krmív obzvlášť citlivých na zohriatie. Malo by sa dbať aj na to, aby samotné prístrojové vybavenie nebolo zdrojom kontaminácie.

Ak prípravu nemožno vykonať bez výrazných zmien v obsahu vlhkosti vzorky, je potrebné obsah vlhkosti určiť pred prípravou a po nej podľa metódy stanovenej v časti A prílohy III.

3. Postup**3.1. Všeobecný postup**

Testovaný podiel sa odoberie z konečnej vzorky. Delenie metódou kužeľov a štvrtienia sa neodporúča, keďže v jeho dôsledku môžu vzniknúť testované podiely s vysokou pravdepodobnosťou chyby z delenia.

3.1.1. Krmivá, ktoré sa môžu priamo drviť

— Preosiata konečná vzorka sa premieša a vloží sa do vhodnej čistej, suchej nádoby so vzduchotesným uzáverom. Na zabezpečenie úplnej homogenizácie sa opätovne premieša bezprostredne pred navážením množstva na analýzu (testovaný podiel).

3.1.2. Krmivá, ktoré sa môžu drviť po vysušení

— Pokiaľ nie je v analytických metódach ustanovené inak, konečná vzorka sa vysuší tak, aby sa jej vlhkosť znížila na 8 až 12 %, v súlade s postupom na predsušenie opísaným v bode 4.3 metódy na stanovenie vlhkosti uvedenej v časti A prílohy III. Ďalej sa postupuje podľa oddielu 3.1.1.

▼ M3**3.1.3. Tekuté alebo polotekuté krmivá**

- Konečná vzorka sa vloží do vhodnej čistej, suchej nádoby so vzduchotesným uzáverom. Na zabezpečenie úplnej homogenizácie sa opätovne premieša bezprostredne pred navážením množstva na analýzu (testovaný podiel).

3.1.4. Iné krmivá

- Konečné vzorky, ktoré sa nedajú pripraviť v súlade s jedným z uvedených postupov, by sa mali upraviť akýmkoľvek iným postupom, ktorým sa zabezpečí, že množstvá navážené na analýzu (testovaný podiel) budú homogénne a reprezentatívne pre konečné vzorky.

3.2. *Osobitný postup v prípade preskúmania prostredníctvom vizuálnej kontroly alebo mikroskopu, alebo v prípade, keď je celá súhrnná vzorka homogenizovaná*

- V prípade preskúmania prostredníctvom vizuálnej kontroly (bez použitia mikroskopu) sa na preskúmanie použije celá laboratórna vzorka.
- V prípade preskúmania pod mikroskopom môže laboratórium zredukovať súhrnnú vzorku alebo zredukovanú vzorku ešte viac zmenšiť. Konečné vzorky na účely obhajoby, prípadne na referenčné účely, sa odoberajú na základe postupu, ktorý je rovnaký ako postup pri konečnej vzorke na účely kontroly.
- V prípade homogenizácie celej súhrnnej vzorky sa konečné vzorky odoberú z homogenizovanej súhrnnej vzorky.

4. Uskladnenie vzoriek

Vzorky sa musia skladovať pri teplote, ktorá nespôsobí zmeny v ich zložení. Vzorky určené na analýzu vitamínov alebo látok, ktoré sú mimoriadne citlivé na svetlo, sa uskladňujú pri takých podmienkach, aby vzorka nebola vystavená negatívnym účinkom svetla.

B. USTANOVENIA TÝKAJÚCE SA CHEMIKÁLIÍ A PRÍSTROJOVÉHO VYBAVENIA POUŽÍVANÝCH PRI ANALYTICKÝCH METÓDACH

1. Pokiaľ nie je v analytických metódach ustanovené inak, všetky chemikálie musia byť analyticky čisté (p.a.). Pri analýze mikroprvkov sa čistota chemikálií musí kontrolovať slepým pokusom. Na základe dosiahnutých výsledkov sa môže vyžadovať ďalšie prečistenie chemikálií.
2. Akýkoľvek krok pracovného postupu zahŕňajúci prípravu roztokov, riedenie, preplachovanie alebo premývanie, uvedený v analytických metódach bez uvedenia použitého rozpúšťadla alebo riediacej kvapaliny znamená, že sa musí použiť voda. Všeobecne platí, že voda musí byť demineralizovaná alebo destilovaná. V konkrétnych prípadoch, ktoré sú uvedené v analytických metódach, sa musí osobitne prečistiť.
3. Vzhľadom na zariadenie bežných kontrolných laboratórií sa pri analytických metódach uvádzajú len špeciálne nástroje a prístrojové vybavenie, alebo také, ktoré vyžadujú osobitné používanie. Musia byť čisté, najmä vtedy, keď ide o stanovenie veľmi malých množstiev látok.

▼ **M3****C. POUŽITIE ANALYTICKÝCH METÓD A VYJADRENIE VÝSLEDKOV****1. Extrakčný postup**

Niektoré metódy si vyžadujú špecifické extrakčné postupy. Vo všeobecnosti platí, že iné extrakčné postupy ako ten, ktorý je uvedený v metóde, sa môžu uplatňovať len pod podmienkou, že sa dokáže, že tento použitý extrakčný postup má rovnakú extrakčnú účinnosť na analyzovanú matricu ako postup uvedený v metóde.

2. Postup čistenia

Niektoré metódy si vyžadujú špecifické postupy čistenia. Vo všeobecnosti platí, že iné postupy čistenia ako ten, ktorý je uvedený v metóde, sa môžu uplatňovať len pod podmienkou, že sa dokáže, že tento použitý postup čistenia má rovnaké analytické výsledky pre analyzovanú matricu ako postup uvedený v metóde.

3. Počet stanovení

Ak je pri analýze nežiaducich látok výsledok prvého stanovenia výrazne (> 50 %) nižší ako špecifikácia, ktorá sa má skontrolovať, nie sú potrebné žiadne ďalšie stanovenia, ak sa použijú vhodné postupy na určenie kvality. V ostatných prípadoch je na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek potrebná dvojnásobná analýza (druhé stanovenie). Na overenie súladu sa použije stredná hodnota týchto dvoch stanovení s prihliadnutím na neistotu merania.

Ak pri kontrole deklarovaného obsahu látky alebo zložky výsledok prvého stanovenia potvrdí deklarovaný obsah, t. j. ak analytický výsledok spadá do rozsahu prijateľnej odchýlky od deklarovaného obsahu, nie sú potrebné žiadne ďalšie stanovenia za podmienky, že sa použijú vhodné postupy na kontrolu kvality. V ostatných prípadoch je na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek potrebná dvojnásobná analýza (druhé stanovenie). Na overenie súladu sa použije stredná hodnota týchto dvoch stanovení s prihliadnutím na neistotu merania.

V niektorých prípadoch sa tento prijateľný rozsah odchýlky definuje v právnych predpisoch, ako napr. v nariadení Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 z 13. júla 2009 o uvádzaní krmív na trh a ich používaní, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 a ktorým sa zrušujú smernica Rady 79/373/EHS, smernica Komisie 80/511/EHS, smernice Rady 82/471/EHS, 83/228/EHS, 93/74/EHS, 93/113/ES a 96/25/ES a rozhodnutie Komisie 2004/217/ES ⁽¹⁾.

4. Správa o použitej metóde analýzy

Správa o analýze musí obsahovať informácie o použitej metóde analýzy.

5. Správa o analytickom výsledku

Analytický výsledok sa vyjadruje spôsobom, ktorý je uvedený v analytickej metóde, príslušným počtom platných číslíc a podľa potreby sa koriguje vzhľadom na obsah vlhkosti v konečnej vzorke pred prípravou.

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 229, 1.9.2009, s. 1.

▼ M3**6. Neistota merania a miera návratnosti v prípade analýzy nežiaducich látok**

Pokiaľ ide o nežiaduce látky v zmysle smernice 2002/32/ES, produkt určený ako krmivo pre zvieratá sa považuje za nevyhovujúci z hľadiska najvyššieho prípustného obsahu, ak sa na základe analytického výsledku, ktorý sa týka krmiva s obsahom vlhkosti 12 %, najvyšší prípustný obsah pokladá za prekročený, pričom sa zohľadňuje rozšírená neistota merania a korekcia vzhľadom na návratnosť. Na posúdenie zhody sa používa analyzovaná koncentrácia korigovaná vzhľadom na návratnosť a po odpočítaní rozšírenej neistoty merania. Tento postup sa používa len v prípadoch, keď analytická metóda umožňuje odhad neistoty merania a korekcie vzhľadom na návratnosť (nie je možné ho použiť napr. v prípade mikroskopickej analýzy).

Správa o analytickom výsledku sa podáva takto (pokiaľ používaná analytická metóda umožňuje odhadnúť neistotu merania a mieru návratnosti):

- a) korigovaný vzhľadom na návratnosť s uvedením miery návratnosti. Korekcia vzhľadom na návratnosť nie je potrebná v prípade, že miera návratnosti je v rozmedzí 90 – 110 %;
- b) ako „ $x \pm U$ “, kde x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania, pričom sa použije koeficient pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti.

Ak je však výsledok analýzy výrazne nižší (> 50 %) ako špecifikácia, ktorá sa má skontrolovať, a za podmienky, že sa uplatňujú vhodné postupy na kontrolu kvality, a ak analýzy slúžia len na účely kontroly dodržania právnych ustanovení, môže sa podať správa o analytickom výsledku bez korekcie vzhľadom na návratnosť, a miera návratnosti, ako aj neistota merania sa v týchto prípadoch môžu zo správy vynechať.



PRÍLOHA III

ANALYTICKÉ METÓDY NA KONTROLU ZLOŽENIA KŔMNYCH SUROVÍN A KŔMNYCH ZMESÍ

A. STANOVENIE VLHKOSTI

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie vlhkosti v krmivách. V prípade, že krmivo obsahuje prchavé látky, ako napr. organické kyseliny, treba si uvedomiť, že spolu s vlhkosťou sa stanoví aj značné množstvo prchavých látok.

Táto metóda sa nevzťahuje na analýzu mliečnych výrobkov ako kŕmnych surovín, analýzu minerálnych látok a zmesí zložených predovšetkým z minerálnych látok, analýzu živočíšnych a rastlinných tukov a olejov, ani na analýzu olejnatých semien a olejnatých plodov.

2. Podstata metódy

Vzorka sa vysuší za špecifikovaných podmienok, ktoré sa líšia podľa druhu krmiva. Úbytok hmotnosti sa stanoví vážením. V prípade krmív tuhého skupenstva, ktoré majú vysoký obsah vlhkosti, je potrebné ich predsušenie.

3. Prístrojové vybavenie

3.1. Mlynček z materiálu, ktorý neabsorbuje vlhkosť, ľahko sa čistí, umožňuje rýchle mletie bez vytvárania znateľného tepla, v najvyššej možnej miere zamedzuje kontaktu s okolitým vzduchom a spĺňa požiadavky uvedené nižšie v bodoch 4.1.1 a 4.1.2 (napr. kladivkové alebo vodou chladené mikromlynčeky, rozoberateľné kužeľové mlynčeky, nízkootáčkové mlynčeky alebo mlynčeky s ozubenými kolesami).

3.2. Analytické váhy s presnosťou na 1 mg.

3.3. Suché vysúšačky z nehrdzavejúceho kovu alebo skla s vrchnákmi zaručujúcimi vzduchotesné uzatvorenie; s pracovným povrchom, na ktorom je možné rozprestrieť skúšobnú vzorku vo vrstve približne 0,3 g/m².

3.4. Elektricky vyhrievaná izotermická sušiareň (± 2 °C), primerane vetraná, s možnosťou rýchlej regulácie teploty⁽¹⁾.

3.5. Nastaviteľná elektricky vyhrievaná vákuová sušiareň vybavená olejovým čerpadlom a buď mechanizmom na vpúšťanie horúceho suchého vzduchu, alebo sušiacou látkou (napr. oxid vápenatý).

3.6. Exsikátor s hrubou perforovanou kovovou alebo porcelánovou platňou obsahujúci účinnú sušiacu látku.

4. Postup

Poznámka: Postupy opísané v tomto oddiele sa musia vykonať ihneď po otvorení balení so vzorkami. Analýza sa musí vykonať aspoň dvakrát.

⁽¹⁾ Pri sušení obilnín, múky, krúpov a šrotu musí mať sušiareň takú tepelnú výkonnosť, aby sa jej teplota nastavená na 131 °C, po vložení najväčšieho počtu skúšobných vzoriek na súčasné sušenie, vrátila na pôvodnú hodnotu do 45 minút. Vetranie sušiarne musí byť také, aby bol rozdiel medzi výsledkami sušenia najväčšieho možného vloženého počtu vzoriek bežnej pšenice počas dvoch hodín a výsledkami získanými po štvorhodinovom sušení menší ako 0,15 %.

▼B4.1. *Príprava*

4.1.1. Krmivá iné ako krmivá patriace pod body 4.1.2 a 4.1.3

Odoberte aspoň 50 g vzorky. Ak je potrebné, rozmeľte alebo rozdeľte ju takým spôsobom, aby sa zamedzilo akejkoľvek odchýlke v obsahu vlhkosti (pozri bod 6).

4.1.2. Obilniny a obilné krúpy

Odoberte aspoň 50 g vzorky. Pomel'te na častice, z ktorých najmenej 50 % prejde sitom s veľkosťou ôk 0,5 mm, a zvyšok, ktorý zostane na site s okrúhlymi okami s veľkosťou 1 mm, bude najviac 10 %.

4.1.3. Krmivá v tekutej alebo pastovitej forme, krmivá prevažne zložené z olejov a tukov

Odoberte približne 25 g vzorky, odvážte s presnosťou na 10 mg, pridajte primerané množstvo bezvodého piesku odváženého s presnosťou na 10 mg a miešajte, až kým sa nezíska homogénny produkt.

4.2. *Sušenie*

4.2.1. Krmivá iné ako krmivá patriace pod body 4.2.2 a 4.2.3

Odvážte vysúšačku (3.3) s vrchnákom s presnosťou na 1 mg. Do odváženej vysúšačky navážte približne 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a rovnomerne rozložte. Vložte vysúšačku bez vrchnáka do sušiarne predhriatej na teplotu 103 °C. Aby ste sa vyhli neželanému poklesu teploty sušiarne, vysúšačku do nej vložte čo najrýchlejšie. Vzorka sa suší štyri hodiny, ktoré sa počítajú od času, keď sa teplota v sušiarni vráti na 103 °C. Na vysúšačku položte vrchnák, vyberte ju z pece, nechajte ju v exsikátore (3.6) počas 30 až 45 minút vychladnúť a odvážte s presnosťou na 1 mg.

Krmivá zložené prevažne z olejov a tukov sušte v sušiarni ešte ďalších 30 minút pri teplote 130 °C. Rozdiel medzi dvomi váženiami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

4.2.2. Obilniny, múka, krúpy a šrot

Odvážte vysúšačku (3.3) s vrchnákom s presnosťou na 0,5 mg. Do odváženej vysúšačky navážte približne 5 g rozdrvenej vzorky s presnosťou na 1 mg a rovnomerne rozložte. Vložte vysúšačku bez vrchnáka do sušiarne predhriatej na teplotu 130 °C. Aby ste sa vyhli neželanému poklesu teploty sušiarne, vysúšačku do nej vložte čo najrýchlejšie. Vzorku nechajte sušiť dve hodiny, ktoré sa počítajú od času, keď sa teplota v sušiarni vráti na 130 °C. Na vysúšačku položte vrchnák, vyberte ju z pece, nechajte ju v exsikátore (3.6) za 30 až 45 minút vychladnúť a odvážte s presnosťou na 1 mg.

4.2.3. Krmná zmes obsahujúca viac ako 4 % sacharózy alebo laktózy: krmné suroviny ako napr. svätotrojnícky chlieb, hydrolyzované obilninové produkty, slad, sušené repné rezky, šťavy z rýb a cukru; krmné zmesi obsahujúce viac ako 25 % minerálnych solí vrátane vody z kryštalizácie.

Odvážte vysúšačku (3.3) s vrchnákom s presnosťou na 0,5 mg. Do odváženej vysúšačky navážte približne 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a rovnomerne rozložte. Vysúšačku bez vrchnáka vložte do vákuovej sušiarne (3.5) predhriatej na teplotu medzi 80 °C a 85 °C. Aby ste sa vyhli neželanému poklesu teploty sušiarne, nádobu do nej vložte čo najrýchlejšie.

Nastavte tlak na 100 torrov a nechajte pri tomto tlaku sušiť štyri hodiny, buď pod prúdom horúceho suchého vzduchu alebo použite sušiaci prostriedok (približne 300 g na 20 vzoriek). V prípade použitia sušiacej látky odpojte vákuové čerpadlo po dosiahnutí predpísaného tlaku. Čas sušenia počítajte od momentu, keď sa teplota v sušiarni vráti na hodnotu

▼B

od 80 °C do 85 °C. Opatrne upravte atmosférický tlak v sušiarňi na pôvodnú hodnotu. Potom ju otvorte, ihneď na vysúšačku položte vrchnák, vyberte ju zo sušiarne, nechajte v exsíkátore (3.6) za 30 až 45 minút vychladnúť a odvážte s presnosťou na 1 mg. Sušte ďalších 30 minút vo vákuovej sušiarňi pri teplote od 80 °C to 85 °C a opäť odvážte. Rozdiel medzi dvomi váženiami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

4.3. *Predsúšenie*

4.3.1. Krmivá iné ako krmivá patriace pod bod 4.3.2

Krmivá tuhého skupenstva s vysokým obsahom vlhkosti, ktoré spôsobujú problémy pri mletí, sa musia predsúšiť podľa nasledujúceho postupu:

Navážte 50 g *nerozdrvenej* vzorky s presnosťou na 10 mg (lisované alebo zhrudkované krmivá sa môžu v prípade potreby rozdrviť nahrubo) vo vhodnej vysúšačke (napr. hliníková platňa s veľkosťou 20 × 12 cm s 0,5 cm rámom). Nechajte sušiť v sušiarňi pri teplote od 60 °C to 70 °C, až kým sa vlhkosť nezníži na 8 % až 12 %. Vytiahnite zo sušiarne, nechajte v laboratóriu nezakrytú po dobu 1 hodiny vychladnúť a odvážte s presnosťou na 10 mg. Vzorku ihneď rozdrvte podľa bodu 4.1.1 a vysušte podľa bodu 4.2.1 alebo 4.2.3 podľa druhu krmiva.

4.3.2. *Obilniny*

Obilné zrná s obsahom vlhkosti vyšším ako 17 % sa musia predsúšiť, a to nasledujúcim postupom:

Navážte 50 g *nerozdrvených* zŕn s presnosťou na 10 mg vo vhodnej vysúšačke (napr. hliníková platňa s veľkosťou 20 × 12 cm s 0,5 cm rámom). Nechajte v sušiarňi 5 až 7 minút sušiť pri teplote 130 °C. Vytiahnite zo sušiarne, nechajte v laboratóriu nezakrytú po dobu 2 hodín vychladnúť a odvážte s presnosťou na 10 mg. Vzorku ihneď rozdrvte podľa bodu 4.1.2 a vysušte podľa bodu 4.2.2.

5. Výpočet výsledkov

Obsah vlhkosti (X), ako percento zo vzorky sa vypočíta podľa tejto rovnice:

5.1. *Sušenie bez predsúšenia*

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

kde:

m = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,
m₀ = hmotnosť vysušenej skúšobnej vzorky v gramoch.

5.2. *Sušenie s predsúšením*

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

kde:

m = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,
m₁ = hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch po predsúšení,
m₂ = hmotnosť skúšobnej vzorky po rozdrvení alebo pomletí v gramoch,
m₀ = hmotnosť vysušenej skúšobnej vzorky v gramoch.

▼ B5.3. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,2 % absolútnej hodnoty vlhkosti.

6. **Poznámky**

Ak vzorku treba upraviť drvením a ak sa zdá, že táto úprava zmení obsah vlhkosti produktu, výsledky analýzy zložiek krmív sa musia upraviť na základe obsahu vlhkosti vzorky v jej pôvodnom stave.

B. STANOVENIE VLHKOSTI V ŽIVOČÍŠNYCH A RASTLINNÝCH TUKOCH A OLEJOCH

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah vody a prchavých látok v živočíšnych a rastlinných tukoch a olejoch.

2. **Podstata metódy**

Vzorka je vysušená na konštantnú hmotnosť (úbytok hmotnosti medzi dvoma za sebou nasledujúcimi váženiami musí byť ≤ 1 mg) pri teplote 103 °C. Úbytok hmotnosti sa stanoví vážením.

3. **Prístrojové vybavenie**

3.1. Miska s plochým dnom z nehrdzavejúceho materiálu s priemerom 8 až 9 cm a výškou približne 3 cm.

3.2. Teplomer so spevnenou guľôčkou a s vyrovnávacou rúrkou na hornom konci, s delenou stupnicou od približne 80 °C do najmenej 110 °C a s dĺžkou približne 10 cm.

3.3. Pieskový kúpeľ alebo elektrická vyhrievacia platňa.

3.4. Exsikátor obsahujúci účinnú sušiacu látku.

3.5. Analytické váhy.

4. **Postup**

Navážte s presnosťou na 1 mg približne 20 g zhomogenizovanej vzorky do suchej odváženej misky (3.1), v ktorej sa nachádza teplomer (3.2). Zohrejte na pieskovom kúpeli alebo vyhrievacej platni (3.3), za trvalého miešania teplomerom tak, aby teplota dosiahla hodnotu 90 °C za približne 7 minút.

Znížte intenzitu ohrevu pozorujúc frekvenciu akou stúpajú bubliny z dna misky. Teplota nesmie presiahnuť hodnotu 105 °C. Pokračujte v miešaní, stierajúc dno misky, kým sa neprestanú tvoriť bubliny.

S cieľom zabezpečiť úplné odstránenie vlhkosti niekoľkokrát znovu zohrejte na teplotu 103 °C $\pm$ 2 °C, pričom medzi jednotlivými zohriatiami ochladte na 93 °C. Potom nechajte vychladnúť na laboratórnu teplotu v exsikátore (3.4) a odvážte. Túto operáciu opakujte dovtedy, kým úbytok hmotnosti medzi dvoma za sebou nasledujúcimi váženiami nebude menší ako 2 mg.

Poznámka: Nárast hmotnosti vzorky po opakovanom zohriatí znamená oxidáciu tuku, v takomto prípade vypočítajte výsledok z váženia vykonaného bezprostredne pred tým, ako začala hmotnosť stúpať.

5. **Výpočet výsledkov**

Obsah vlhkosti (*X*), ako percento vzorky, je daný nasledujúcim vzorcom:

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

▼ B

kde:

m = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,
 m_1 = hmotnosť misky v gramoch s obsahom pred zohrievaním,
 m_2 = hmotnosť misky v gramoch s obsahom po zohriatí.

Výsledky menšie ako 0,05 % sa musia vyjadriť ako „menej ako 0,05 %“.

Opakovateľnosť

Rozdiel vo vlhkosti medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,05 % v absolútnej hodnote.

C. STANOVENIE OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTOK

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah dusíkatých látok na základe obsahu dusíka stanoveného podľa Kjeldahlovej metódy.

2. Podstata metódy

Vzorka sa mineralizuje kyselinou sírovou v prítomnosti katalyzátora. Kyslý roztok sa zalkalizuje roztokom hydroxidu sodného. Amoniak sa oddestiluje a zachytí v odmeranom množstve kyseliny sírovej, ktorej prebytok sa titruje štandardným roztokom hydroxidu sodného.

Uvoľnený amoniak sa eventuálne oddestiluje do prebytku roztoku kyseliny boritej, po čom nasleduje titrácia roztokom kyseliny chlorovodíkovej alebo kyseliny sírovej.

3. Chemikálie

- 3.1. Síran draselný.
- 3.2. Katalyzátor: oxid meďnatý (II) CuO alebo pentahydrát síranu meďnatého (II), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Granulovaný zinok.
- 3.4. Kyselina sírová, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Kyselina sírová, štandardný odmerný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Kyselina sírová, štandardný odmerný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Kyselina sírová, štandardný odmerný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Indikátor metylčerven; rozpustíte 300 mg metylčervene v 100 ml etanolu, $\sigma = 95 - 96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Roztok hydroxidu sodného (môže sa použiť technicky čistý) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.
- 3.10. Hydroxid sodný, štandardný odmerný roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Hydroxid sodný, štandardný odmerný roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Granulovaná pemza premytá kyselinou chlorovodíkovou a vyžíhaná.
- 3.13. Acetanilid (b.t. = 114°C , N-obsah = 10,36 %).
- 3.14. Sacharóza (bez dusíka).
- 3.15. Kyselina boritá (H_3BO_3).
- 3.16. Indikátorový roztok metylčervene: rozpustíte 100 mg metylčervene v 100 ml etanolu alebo metanolu.

▼B

- 3.17. Roztok bromkrezolovej zelene: rozpustite 100 mg bromkrezolovej zelene v 100 ml etanolu alebo metanolu.
- 3.18. Roztok kyseliny boritej (10 g/l až 40 g/l v závislosti od použitého prístrojového vybavenia)

Ak sa použije kolorimetrická detekcia bodu ekvivalencie, do roztokov kyseliny boritej sa musia pridať indikátory metylčervé a bromkrezol. Ak sa pripravuje 1 liter kyseliny boritej, pred úpravou objemu sa pridá 7 ml indikátorového roztoku metylčervene (3.16) a 10 ml roztoku bromkrezolovej zelene (3.17).

V závislosti od použitej vody sa môže pH jednotlivých roztokov kyseliny boritej líšiť. Často je potrebná úprava pomocou malého objemu zásaditej látky tak, aby sme získali vhodné pH.

Poznámka: Pridanie cca 3 až 4 ml NaOH (3.11) do 1 litra 10 g/l kyseliny boritej je zvyčajne dobrou metódou úpravy. Roztok skladujte pri izbovej teplote a počas skladovania ho chráňte pred svetlom a zdrojom amoniakových výparov.

- 3.19 Štandardný odmerný roztok kyseliny chlorovodíkovej $c(\text{HCL}) = 0,10$ mol/l.

Poznámka: Možno použiť aj iné koncentrácie odmerných roztokov (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 a 3.19), ak sa to zohľadní pri výpočtoch. Koncentrácie by sa vždy mali vyjadriť s presnosťou na štyri desatinné miesta.

4. Prístrojové vybavenie

Prístrojové vybavenie je vhodné na vykonanie mineralizácie, destilácie a titrácie podľa Kjeldahlovej metódy.

5. Postup

5.1. Mineralizácia

Navážte 1 g vzorky s presnosťou na 0,001 g a vzorku preneste do mineralizačnej banky. Pridajte 15 g síranu draselného (3.1), vhodné množstvo katalyzátora (3.2) [0,3 až 0,4 g oxidu meďnatého (II) alebo 0,9 až 1,2 g pentahydrátu síranu meďnatého (II)], 25 ml kyseliny sírovej (3.4) a v prípade potreby niekoľko granúl pemzy (3.12) a premiešajte.

Banku najskôr mierne zahrievajte, ak je potrebné, obsah občas premiešajte, až kým hmota zuhoľnatie a kým sa prestane tvoriť pena; potom zahrievajte intenzívnejšie, až kým kvapalina nedosiahne trvalý var. Zahrievanie je primerané vtedy, keď vriaca kyselina kondenzuje na stenách banky. Zabráňte prehriatiu stien banky a zachytávaniu organických častíc na nich.

Keď sa roztok vyčíri a získa svetlozelenú farbu, pokračujte vo vare ešte ďalšie dve hodiny, potom nechajte vychladnúť.

5.2. Destilácia

Opatrne pridajte dostatočné množstvo vody, aby sa sírany úplne rozpustili. Nechajte vychladnúť a potom v prípade potreby pridajte niekoľko granúl zinku (3.3). Postupujte podľa bodov 5.2.1 alebo 5.2.2.

5.2.1. Destilácia do kyseliny sírovej

Do zachytávacej banky destilačného prístroja dajte presne odmerané množstvo 25 ml kyseliny sírovej (3.5) alebo (3.7) v závislosti od predpokladaného obsahu dusíka. Pridajte niekoľko kvapiek indikátora metylčervene (3.8).

▼B

Pripojte mineralizačnú banku na chladič destilačného prístroja a ponorte koniec chladiča do kvapaliny nachádzajúcej sa v zachytávacej banke do hĺbky najmenej 1 cm (pozri poznámku 8.3). Pomaly nalejte 100 ml roztoku hydroxidu sodného (3.9) do mineralizačnej banky bez straty amoniaku (pozri poznámku 8.1). Banku zahrievajte až do úplného predstílovania amoniaku.

5.2.2. Destilácia do kyseliny boritej

V prípade manuálnej titrácie amoniakového obsahu destilátu sa uplatňuje nižšie opísaný postup. V prípade, že destilačná jednotka je plne automatizovaná a zahŕňa titráciu amoniakového obsahu destilátu, dodržiavajte pokyny pre prevádzku destilačnej jednotky.

Umiestnite zachytávaciu banku s obsahom 25 až 30 ml roztoku kyseliny boritej (3.18) pod otvor chladiča tak, že vývod chladiča je ponorená pod hladinu roztoku kyseliny boritej, ktorá je v prebytku. Prispôbte destilačnú jednotku na dávkovanie 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.9). S destilačnou jednotkou pracujte podľa pokynov výrobcu a destilujte amoniak uvoľnený pridaním roztoku hydroxidu sodného. Zachytávajte destilát do zachytávacieho roztoku kyseliny boritej. Množstvo destilátu (doba parnej destilácie) závisí od množstva dusíka vo vzorke. Dodržujte pokyny výrobcu.

Poznámka: V poloautomatickej destilačnej jednotke sa dopĺňanie zvyšného hydroxidu sodného a parná destilácia vykonávajú automaticky.

5.3. Titrácia

Postupujte podľa bodu 5.3.1 alebo 5.3.2.

5.3.1. Kyselina sírová

Titrujte prebytočnú kyselinu sírovú v zachytávacej banke s roztokom hydroxidu sodného (3.10 alebo 3.11) v závislosti od koncentrácie použitej kyseliny sírovej až do dosiahnutia bodu ekvivalencie.

5.3.2. Kyselina boritá

Titrujte obsah zachytávacej banky so štandardným odmerným roztokom kyseliny chlorovodíkovej (3.19) alebo štandardným odmerným roztokom kyseliny sírovej (3.6) použitím byrety a prečítajte množstvo použitého titračného roztoku.

Ak sa použije kolorimetrická detekcia bodu ekvivalencie, bod ekvivalencie sa dosiahne pri prvom sfarbení obsahu na ružovo. Odčítajte objem byrety s presnosťou na 0,05 ml. Bod ekvivalencie možno lepšie vidieť, ak sa použije osvietená magnetická platňa na miešanie alebo fotometrický detektor.

Tento postup možno vykonať automaticky použitím parného destilátora s automatickou titráciou.

Pri prevádzke špecifického destilátora alebo destilátora/titrátora dodržiavajte pokyny výrobcu.

Poznámka: Pri použití automatického titračného systému sa titrácia začína hneď po začatí destilácie a použije sa 1 % roztok kyseliny boritej (3.18).

▼ B

Pri použití plne automatickej destilačnej jednotky sa automatická titrácia amoniaku môže vykonať aj pomocou detekcie bodu ekvivalencie použitím potenciometrického pH systému.

V tomto prípade sa použije automatický titrátor s pH-metrom. Tento pH-meter má byť správne nakalibrovaný v rozsahu pH od 4 do 7 podľa bežných laboratórnych postupov týkajúcich sa kalibrácie pH.

Bod ekvivalencie titrácie pH sa dosiahne pri hodnote pH 4,6, pričom ide o bod obratu na titračnej krivke (inflexný bod).

5.4. *Slepý pokus*

Vykonajte slepý pokus, ktorým sa potvrdí, že chemikálie neobsahujú dusík (mineralizáciou, destiláciou a titráciou), s použitím 1 g sacharózy (3.14) namiesto vzorky.

6. **Výpočet výsledkov**

Výpočty sa robia podľa bodu 6.1 alebo 6.2.

6.1. *Výpočet pri titrácii podľa bodu 5.3.1*

Obsah dusíkatých látok vyjadrený ako percentuálny podiel hmotnosti sa vypočíta podľa tohto vzorca:

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

kde:

V_0 = objem (ml) NaOH (3.10 alebo 3.11) použitého pri slepom pokuse,
 V_1 = objem (ml) NaOH (3.10 alebo 3.11) použitého pri titrácii vzorky,
 c = koncentrácia (mol/l) hydroxidu sodného (3.10 alebo 3.11),
 m = hmotnosť (g) vzorky.

6.2. *Výpočet pri titrácii podľa bodu 5.3.2*

6.2.1. Titrácia s kyselinou chlorovodíkovou

Obsah dusíkatých látok vyjadrený ako percentuálny podiel hmotnosti sa vypočíta podľa tohto vzorca:

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

kde:

m = hmotnosť (g) skúšobnej vzorky,
 c = koncentrácia (mol/l) štandardného odmerného roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.19),
 V_0 = objem (ml) kyseliny chlorovodíkovej použitej pri slepom pokuse,
 V_1 = objem (ml) kyseliny chlorovodíkovej použitej na skúšobnú vzorku.

6.2.2. Titrácia s kyselinou sírovou

Obsah dusíkatých látok vyjadrený ako percentuálny podiel hmotnosti sa vypočíta podľa tohto vzorca:

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

▼B

kde:

m = hmotnosť (g) skúšobnej vzorky,
 c = koncentrácia (mol/l) štandardného odmerného roztoku kyseliny sírovej (3.6),
 V_0 = objem (ml) kyseliny sírovej (3.6) použitej pri slepom pokuse,
 V_1 = objem (ml) kyseliny sírovej (3.6) použitej na skúšobnú vzorku.

7. Overenie metódy

7.1. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

- 0,2 % v absolútnej hodnote pre obsah dusíkatých látok nižší ako 20 %,
- 1,0 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah dusíkatých látok od 20 % do 40 %,
- 0,4 % v absolútnej hodnote pre obsah dusíkatých látok vyšší ako 40 %.

7.2. Správnosť

Vykonajte analýzu (mineralizáciu, destiláciu a titráciu) na 1,5 až 2,0 g acetanilidu (3.13) v prítomnosti 1 g sacharózy (3.14); na 1 g acetanilidu sa spotrebuje 14,80 ml kyseliny sírovej (3.5). Návratnosť musí byť aspoň 99 %.

8. Poznámky

- 8.1. Prístrojové vybavenie môže byť manuálne, poloautomatické a automatické. Ak si vybavenie vyžaduje prenos medzi krokom mineralizácie a destilácie, musí sa vykonať bez toho, aby došlo k stratám. Ak zachytávacia banka destilačného prístroja nie je vybavená prikvpkávacím lievikom, pridajte bezprostredne pred jej pripojením na chladič hydroxid sodný pomalým prilievaním kvapaliny po stene banky.
- 8.2. Ak zmineralizovaná látka stuhne, zopakujte stanovenie s použitím väčšieho množstva kyseliny sírovej (3.4) ako je množstvo uvedené vyššie.
- 8.3. Pri produktoch s nižším obsahom dusíka možno v prípade potreby objem kyseliny sírovej (3.7) pridávanej do zachytávacej banky znížiť na 10 alebo 15 ml a doplniť vodou na 25 ml.
- 8.4. Pri rutinej analýze sa na stanovenie dusíkatých látok môžu použiť alternatívne metódy, no referenčnou metódou je Kjeldahlova metóda opísaná v časti C. Ekvivalencia výsledkov získaných alternatívnou metódou (napr. DUMAS) v porovnaní s referenčnou metódou sa musí dokázať samostatne pri každej matrici. Keďže výsledky získané alternatívnou metódou sa môžu aj v prípade overenia ekvivalencie nepatrne odchyľovať od výsledkov získaných referenčnou metódou, je potrebné v správe o analýze uviesť metódu analýzy použitú pri stanovení dusíkatých látok.

D. STANOVENIE MOČOVINY

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu močoviny v krmivách.

▼B**2. Podstata metódy**

Vzorka sa rozmieša vo vode s číriacim činidlom. Suspenzia sa prefiltruje. Obsah močoviny vo filtráte sa stanovuje po pridaní 4-dimetylaminobenzaldehydu (4-DMAB) zmeraním absorpcie pri vlnovej dĺžke 420 nm.

3. Chemikálie

- 3.1. Roztok 4-dimetylaminobenzaldehydu: rozpustíte 1,6 g 4-DMAB v 100 ml 96 % etanolu a pridajte 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (p_{20} 1,19 g/ml). Túto chemikáliu možno uchovávať maximálne dva týždne.
- 3.2. Carrezovo činidlo I: Rozpustíte vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: Rozpustíte vo vode 10,6 g trihydrátu feročyanidu draselného, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.4. Aktívne uhlie, ktoré neabsorbuje močovinu (je potrebné skontrolovať).
- 3.5. Močovina, 0,1 % roztok (w/v).

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Mixér (trepačka): Približne 35 až 40 ot/min.
- 4.2. Skúmavky: 160 × 16 mm so zábrusovými zátkami.
- 4.3. Spektrofotometer.

5. Postup**5.1. Analýza vzorky**

Navážte 2 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte spolu s 1 g aktívneho uhlia (3.4) do 500 ml odmernej banky. Pridajte 400 ml vody a 5 ml Carrezovho činidla I (3.2), miešajte približne 30 sekúnd a pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.3). Miešajte 30 minút v trepačke. Doplňte objem vodou, potrepajte a prefiltrujte.

Odoberte 5 ml z číreho bezfarebného filtrátu do skúmaviek so zábrusovými zátkami, pridajte 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1) a premiešajte. Skúmavky umiestnite do vodného kúpeľa s teplotou 20 °C (+/- 4 °C). Po pätnástich minútach zmerajte absorpciu roztoku vzorky pomocou spektrofotometra pri 420 nm. Porovnajte so slepým pokusom z použitých chemikálií.

5.2. Kalibračná krivka

Odoberte objemy 1, 2, 4, 5 a 10 ml z roztoku močoviny (3.5), vložte každý do jednej 100 ml odmernej banky a doplňte objem vodou. Odoberte z každého roztoku 5 ml, pridajte do každého 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1), zhomogenizujte a zmerajte absorpciu podľa vyššie uvedeného postupu porovnaním s kontrolným roztokom obsahujúcim 5 ml 4-DMAB a 5 ml vody bez močoviny. Zakreslite kalibračnú krivku.

6. Výpočet výsledkov

Množstvo močoviny vo vzorke sa stanoví pomocou kalibračnej krivky.

Výsledok sa vyjadrí ako percento zo vzorky.

7. Poznámky

- 7.1. V prípade, že obsah močoviny presahuje 3 %, zredukujte vzorku na 1 g alebo rozriedte pôvodný roztok tak, aby v 500 ml nebolo viac ako 50 mg močoviny.

▼B

- 7.2. V prípade nízkeho obsahu močoviny vzorku zväčšite až dovtedy, kým filtrát zostane číry a bezfarebný.
- 7.3. Ak vzorka obsahuje dusíkaté zlúčeniny, ako sú aminokyseliny, absorbciu treba merať pri 435 nm.

E. STANOVENIE PRCHAVÝCH DUSÍKATÝCH LÁTOK**I. MIKRODIFÚZIOU****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah prchavých dusíkatých látok v krmivách vyjadrených ako amoniak.

2. Podstata metódy

Vzorka sa extrahuje s vodou a roztok sa vyčirí a prefiltruje. Prchavé dusíkaté látky sú vytesnené mikrodifúziou s použitím roztoku uhličitanu draselného, zachytené v roztoku kyseliny boritej a titrované kyselinou sírovou.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina trichlóroctová, roztok 20 % (w/v).
 - 3.2. Indikátor: Rozpustíte 33 mg bromkrezolovej zelene a 65 mg metylčervene v 100 ml 95 % – 96 % (v/v) etanolu.
 - 3.3. Roztok kyseliny boritej: v odmernej banke s objemom 1 liter rozpustíte 10 g kyseliny boritej v 200 ml 95 % – 96 % (v/v) etanolu a 700 ml vody. Pridajte 10 ml indikátora (3.2). Premiešajte a v prípade potreby upravte farbu roztoku na bledočervenú pridaním roztoku hydroxidu sodného. V 1 ml tohto roztoku sa zachytí najviac 300 µg NH₃.
 - 3.4. Nasýtený roztok uhličitanu draselného: Rozpustíte 100 g uhličitanu draselného v 100 ml vriacej vody. Nechajte vychladnúť a prefiltrujete.
 - 3.5. Kyselina sírová, 0,01 mol/liter.
- 4. Prístrojové vybavenie**
- 4.1. Mixér (trepačka): približne 35 až 40 ot/min.
 - 4.2. Sklenené alebo plastové Conwayove misky (pozri diagram).
 - 4.3. Mikrobyrety delené na 1/100 ml.

5. Postup

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte ju so 100 ml vody do odmernej banky s objemom 200 ml. Mixujte alebo miešajte 30 minút v trepačke. Pridajte 50 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.1), doplňte vodou na celkový objem, rázne potrepťe a prefiltrujte cez skladaný filter.

Použitím pipety dajte 1 ml roztoku kyseliny boritej (3.3) do stredu Conwayovej misky a 1 ml filtrátu vzorky do medzikružia misky. Čiasťtočne prikryte vazelinou natretým vrchnákom. Rýchlo prikvapnite 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu draselného (3.4) do medzikružia misky a vzduchotesne uzatvorte vrchnákom. Opatrne otáčajte misku v horizontálnej polohe tak, aby sa zmiešali obe chemikálie. Nechajte inkubovať aspoň štyri hodiny pri laboratórnej teplote alebo hodinu pri teplote 40 °C.

Použitím mikrobyrety (4.3) titrujte prchavé látky v roztoku kyseliny boritej s kyselinou sírovou (3.5).

Urobte slepý pokus podľa toho istého postupu, no bez vzorky, ktorá sa má analyzovať.

▼ B**6. Výpočet výsledkov**

1 ml H_2SO_4 0,01 mol/liter zodpovedá 0,34 mg amoniaku.

Vyjadrite výsledok ako percento zo vzorky.

Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

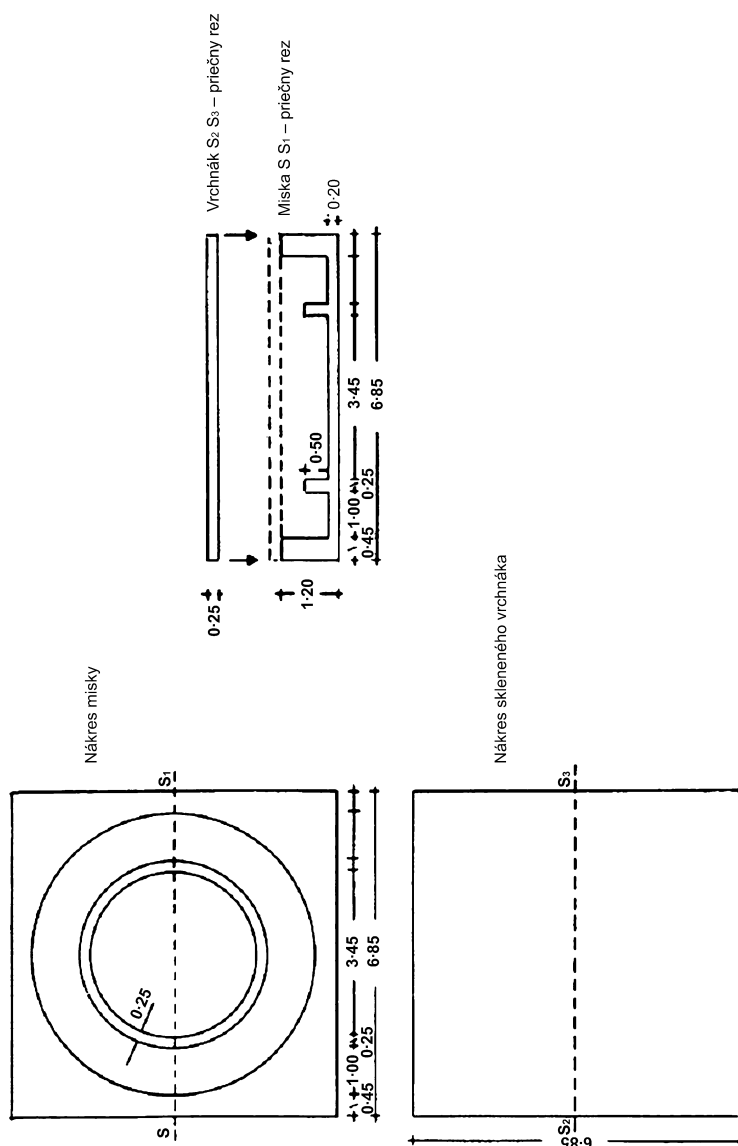
- 10 % v relatívnej hodnote pre obsah amoniaku nižší ako 1,0 %,
- 0,1 % v absolútnej hodnote pre obsah amoniaku 1,0 % alebo viac.

7. Poznámky

Ak obsah amoniaku vo vzorke presiahne 0,6 %, pôvodný filtrát rozriedzte.

CONWAYOVE MISKY

Mierka 1/1



▼B**II. DESTILÁCIOU****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah prchavých dusíkatých látok, vyjadrených ako amoniak, v rybej múčke, ktorá prakticky neobsahuje močovinu. Používa sa len pri obsahu amoniaku nižšom ako 0,25 %.

2. Podstata metódy

Vzorka sa extrahuje s vodou a roztok sa vyčíri a prefiltruje. Prchavé dusíkaté látky sa vytesnia pri bode varu pridaním oxidu horečnatého a zachytia v špecifikovanom množstve kyseliny sírovej, ktorej prebytok sa spätne titruje s roztokom hydroxidu sodného.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina trichlóroctová, roztok 20 % (w/v).
- 3.2. Oxid horečnatý.
- 3.3. Emulzia proti peneniu (napr. silikón).
- 3.4. Kyselina sírová, 0,05 mol/liter.
- 3.5. Roztok hydroxidu sodného 0,1 mol/liter.
- 3.6. Roztok metylčervene 0,3 % v 95 % – 96 % (v/v) etanole.

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Mixér (trepačka): približne 35 až 40 ot/min.
- 4.2. Kjeldahlov destilačný prístroj.

5. Postup

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte ju spolu so 100 ml vody do odmernej banky s objemom 200 ml. Mixujte alebo miešajte v trepačke 30 minút. Pridajte 50 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.1), doplňte objem vodou, rázne potrepte a prefiltrujte cez skladaný filter.

Odoberte čistý filtrát v množstve primeranom predpokladanému obsahu prchavých dusíkatých látok (100 ml je zvyčajne vhodné množstvo). Rozriedte na 200 ml a pridajte 2 g oxidu horečnatého (3.2) a niekoľko kvapiek emulzie proti peneniu (3.3). Roztok musí reagovať na lakmusový papier zásadito; v opačnom prípade pridajte trochu oxidu horečnatého (3.2). Postupujte podľa bodov 5.2 a 5.3 analytickej metódy na stanovenie obsahu dusíkatých látok (časť C tejto prílohy).

Urobte *slepý pokus* podľa toho istého postupu, no bez vzorky, ktorá sa má analyzovať.

6. Výpočet výsledkov

1 ml H_2SO_4 0,05 mol/liter zodpovedá 1,7 mg amoniaku.

Výsledok sa vyjadrí ako percento zo vzorky.

Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % amoniaku v relatívnej hodnote.

F. STANOVENIE AMINOKYSELÍN (OKREM TRYPTOFÁNU)**1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie voľných (syntetických a prírodných) a celkových (viazaných peptidickou väzbou a voľných) aminokyselín v krmivách s použitím analyzátora aminokyselín. Je použiteľná pre

▼ B

tieto aminokyseliny: cysteín (cystín), metionín, lyzín, treonín, alanín, arginín, kyselinu asparágovú, kyselinu glutámovú, glycín, histidín, izoleucín, leucín, fenylalanín, prolín, serín, tyrozín a valín.

Táto metóda nedokáže rozlíšiť soli aminokyselín a nedokáže diferencovať medzi D a L formami aminokyselín. Neplatí pre stanovenie tryptofánu alebo hydroxyanalógov aminokyselín.

2. Podstata metódy

2.1. Voľné aminokyseliny

Voľné aminokyseliny sa extrahujú zriedenou kyselinou chlorovodíkovou. Spolu vyextrahované dusíkové makromolekuly sa vyzrážajú kyselinou sulfosalicylovou a odstránia sa filtráciou. Hodnota pH prefiltrovaného roztoku sa upraví na 2,20. Aminokyseliny sa oddelia pomocou iónovo-výmennej chromatografie a stanovia sa reakciou s ninhydrínom pomocou fotometrickej detekcie pri 570 nm.

2.2. Celkové aminokyseliny

Zvolený postup závisí od aminokyselín, ktoré sa majú skúmať. Cysteín (cystín) a metionín sa musia pred hydrolýzou zoxidovať na kyselinu cysteovú a metionín sulfón. Tyrozín sa musí stanoviť v hydrolyzátach neoxidovaných vzoriek. Všetky ostatné aminokyseliny uvedené v bode 1 sa dajú stanoviť v oxidovanej alebo neoxidovanej vzorke.

Oxidácia sa vykoná pri 0 °C zmesou kyseliny permravej a fenolu. Prebytočné oxidačné činidlo sa rozloží pomocou disiričitanu disodného. Oxidovaná alebo neoxidovaná vzorka sa hydrolizuje 23 hodín kyselinou chlorovodíkovou (3.20). Hodnota pH hydrolyzáta sa upraví na 2,20. Aminokyseliny sa oddelia pomocou iónovo-výmennej chromatografie a stanovia sa reakciou s ninhydrínom pomocou fotometrickej detekcie pri 570 nm (v prípade prolínu pri 440 nm).

3. Chemikálie

Musí sa použiť dvakrát destilovaná voda alebo voda rovnakej kvality (vodivosť < 10µS).

- 3.1. Peroxid vodíka, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Kyselina mravčia, w (w/w) = 98 – 100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Disiričitan sodný
- 3.5. Hydroxid sodný
- 3.6. Dihydrát kyseliny 5-sulfosalicylovej
- 3.7. Kyselina chlorovodíková, hustota približne 1,18 g/ml.
- 3.8. Dihydrát citranu trojsodného.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglykol).
- 3.10. Chlorid sodný.
- 3.11. Ninhydrín.
- 3.12. Petroléter, rozpätie bodu varu 40 – 60 °C.
- 3.13. Norleucín alebo iná zlúčenina vhodná na použitie ako vnútorný štandard.

▼B

- 3.14. Plynňý dusík (< 10 ppm kyslíka).
- 3.15. 1-oktanol.
- 3.16. Aminokyseliny.
- 3.16.1. Štandardné látky uvedené v odseku 1. Čisté zlúčeniny bez obsahu vody z kryštalizácie. Pred použitím ich sušte vo vákuu jeden týždeň nad P_2O_5 alebo H_2SO_4 .
- 3.16.2. Kyselina cysteová
- 3.16.3. Metionín sulfón.
- 3.17. Roztok hydroxidu sodného $c = 7,5$ mol/l:
Rozpustite 300 g NaOH (3.5) vo vode a objem doplňte na 1 liter.
- 3.18. Roztok hydroxidu sodného $c = 1$ mol/l:
Rozpustite 40 g NaOH (3.5) vo vode a objem doplňte na 1 liter.
- 3.19. Roztok kyseliny mravčej a fenolu:
Zmiešajte 889 g kyseliny mravčej (3.2) so 111 g vody a pridajte 4,73 g fenolu (3.3).
- 3.20. Hydrolyzačná zmes, $c = 6$ mol HCl/l s obsahom 1 g fenolu/l:
Pridajte 1 g fenolu (3.3) k 492 ml HCl (3.7) a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.21. Extrakčná zmes, $c = 0,1$ mol HCl/l s obsahom 2 % tiodiglykolu: Vezmite 8,2 ml HCl (3.7), rozriedte s približne 900 ml vody, pridajte 20 ml tiodiglykolu (3.9) a objem doplňte vodou na 1 liter (nezmiešajte 3.7 a 3.9 priamo).
- 3.22. Kyselina 5-sulfosalicylova, $\beta = 6$ %:
Rozpustite 60 g kyseliny 5-sulfosalicylovej (3.6) vo vode a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.23. Oxidačná zmes (kyselina permravčia – fenol):
Zmiešajte 0,5 ml peroxidu vodíka (3.1) so 4,5 ml roztoku kyseliny mravčej s fenolom (3.19) v malej kadičke. Inkubujte pri teplote 20 – 30 °C 1 hodinu, aby sa vytvorila kyselina permravčia, potom nechajte vychladnúť v ľadovom kúpeli (15 minút) pred pridaním k vzorke.
Upozornenie: Vyhnite sa kontaktu s kožou a použite ochranný odev.
- 3.24. Citranový tlmivý roztok, $c = 0,2$ mol Na^+ /l, pH 2,20:
Rozpustite 19,61 g citranu sodného (3.8), 5 ml tioglykolu (3.9), 1 g fenolu (3.3) a 16,50 ml HCl (3.7) v približne 800 ml vody. Upravte pH na 2,20. Doplňte objem vodou na 1 liter.
- 3.25. Elučné tlmivé roztoky pripravené podľa podmienok pre použitý analyzátor (4.9).
- 3.26. Nihydrinové činidlo pripravené podľa podmienok pre použitý analyzátor (4.9).
- 3.27. Štandardné roztoky aminokyselín. Tieto roztoky treba skladovať pri teplote pod 5 °C.

▼ B

3.27.1. Zásobný štandardný roztok aminokyselín (3.16.1).

$c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ každá v kyseline chlorovodíkovej.

Možno ich získať aj komerčne.

3.27.2. Zásobný štandardný roztok kyseliny cysteovej a metionín sulfónu, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Rozpustíte 0,2115 g kyseliny cysteovej (3.16.2) a 0,2265 g metionín sulfónu (3.16.3) v citranovom tlmivom roztoku (3.24) v 1 l odmernej banke a doplňte po značku citranovým tlmivým roztokom. Skladujte pri teplote pod $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ najviac podobu 12 mesiacov. Tento roztok sa nepoužíva, ak zásobný štandardný roztok (3.27.1) obsahuje kyselinu cysteovú a metionín sulfón.

3.27.3. Zásobný štandardný roztok vnútorného štandardu napr. norleucín, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.

Rozpustíte 0,6560 g norleucínu (3.13) v citranovom tlmivom roztoku (3.24) v odmernej banke a doplňte objem citranovým tlmivým roztokom na 250 ml. Skladujte pri teplote pod $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ najviac po dobu 6 mesiacov.

3.27.4. Kalibračný roztok štandardných aminokyselín na použitie s hydrolyzátmi, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ kyseliny cysteovej a metionín sulfónu a $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ ostatných aminokyselín. Rozpustíte 2,2 g chloridu sodného (3.10) v 100 ml kadičke s 30 ml citranového tlmivého roztoku (3.24). Pridajte 4,00 ml zásobného štandardného roztoku aminokyselín (3.27.1), 4,00 ml zásobného štandardného roztoku kyseliny cysteovej a metionín sulfónu (3.27.2) a 0,50 ml zásobného štandardného roztoku vnútorného štandardu (3.27.3), ak sa používa. Hydroxidom sodným (3.18) upravte pH na 2,20.

Prenešte kvantitatívne do 50 ml odmernej banky a doplňte po značku citranovým tlmivým roztokom (3.24) a premiešajte.

Skladujte pri teplote pod $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ najviac po dobu 3 mesiacov.

Pozri poznámku 9.1.

3.27.5. Kalibračný roztok štandardných aminokyselín na použitie s hydrolyzátmi pripravenými podľa odseku 5.3.3.1 a na použitie s extraktmi (5.2). Kalibračný roztok sa pripravuje podľa 3.27.4, no bez použitia chloridu sodného.

Skladujte pri teplote pod $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ po dobu najviac 3 mesiace.

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Banka s guľatým dnom s objemom 100 alebo 250 ml vybavená spätným chladičom.

4.2. Fľaša z borokremičitého skla s objemom 100 ml so skrutkovým uzáverom s gumovou/teflonovou podložkou (napr. Duran, Schott) na použitie v sušiarňi.

4.3. Sušiareň s nútenou ventiláciou a regulátorom teploty s presnosťou vyššou ako $\pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

4.4. pH meter (s presnosťou na tri desatinné miesta).

4.5. Membránový filter ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$).

4.6. Odstredivka.

4.7. Rotačná vákuová odparka.

4.8. Mechanická trepačka alebo magnetické miešadlo.

▼B

- 4.9. Analyzátor aminokyselín alebo zariadenie HPLC s iónovo-výmennou kolónou, zariadenie pre ninhydrín, postkolónová derivatizačná jednotka a fotometrický detektor.

Kolóna je naplnená sulfónovanými polystyrénovými živcami, ktoré sú schopné oddeliť aminokyseliny navzájom, ako aj od iných ninhydrín-pozitívnych materiálov. Prietok pre tlmivý roztok a ninhydrín zabezpečujú pumpy, ktoré majú stabilitu prietoku $\pm 0,5 \%$ v dobe, počas ktorej sa vykoná aj kalibrácia pomocou štandardu aj analyzovanie vzorky.

U niektorých analyzátorov aminokyselín sa môžu použiť také postupy hydrolyzy, v ktorých hydrolyzát má koncentráciu sodíka $c = 0,8 \text{ mol/l}$ a obsahuje všetku zvyškovú kyselinu mravčiu z oxidácie. Iné analyzátory nedokážu uspokojivo oddeliť aminokyseliny, ak hydrolyzát obsahuje prebytok kyseliny mravej a/alebo vysoké koncentrácie sodíkového iónu. V tomto prípade sa objem kyseliny zredukuje odparením na približne 5 ml po hydrolyze a pred úpravou pH. Odparenie musí prebehnúť vo vákuu pri teplote najviac 40°C .

5. Postup

5.1. *Príprava vzorky*

Vzorka sa pomelie tak, aby prepadla sitom s veľkosťou ôk $0,5 \text{ mm}$. Vzorky s vysokým obsahom vlhkosti sa pred mletím musia vysušiť buď vzduchom pri teplote do 50°C , alebo lyofilizáciou. Vzorky s vysokým obsahom tuku treba pred mletím extrahovať s petroleterom (3.12).

5.2. *Stanovenie voľných aminokyselín v krmivách a v premixoch*

Navážte s presnosťou na $0,2 \text{ mg}$ primerané množstvo ($1 - 5 \text{ g}$) pripravenej vzorky (5.1) do Erlenmeyerovej banky a pridajte $100,0 \text{ ml}$ extrakčnej zmesi (3.21). Zmes trepte 60 min. použitím mechanickej trepačky alebo magnetického miešadla (4.8). Nechajte sediment usadiť a pipetou odoberte $10,0 \text{ ml}$ z roztoku nad sedimentom do kadičky s objemom 100 ml .

Primiešajte $5,0 \text{ ml}$ roztoku kyseliny 5-sulfosalicylovej (3.22) a pokračujte v miešaní pomocou magnetického miešadla po dobu 5 minút. Roztok nad sedimentom odstred'te alebo prefiltrujte, aby sa odstránili všetky zrazeniny. Preneste $10,0 \text{ ml}$ výsledného roztoku do 100 ml kadičky a upravte pH na $2,20$ použitím roztoku hydroxidu sodného (3.18), preneste do odmernej banky primeraného objemu s použitím citranového tlmivého roztoku (3.24) a doplňte týmto roztokom (3.24) po značku.

Ak sa používa vnútorný štandard, pridajte $1,00 \text{ ml}$ vnútorného štandardu (3.27.3) na každých 100 ml konečného roztoku a doplňte citranovým tlmivým roztokom (3.24) po značku.

Pristúpte k ďalšiemu kroku, ktorým je chromatografia, podľa odseku 5.4.

Ak sa extrakty neanalyzujú v ten istý deň, musia sa uskladniť pri teplote pod 5°C .

5.3. *Stanovenie celkových aminokyselín*

5.3.1. *Oxidácia*

Navážte s presnosťou na $0,2 \text{ mg}$ $0,1 - 1 \text{ g}$ pripravenej vzorky (5.1) do:

— 100 ml banky s guľatým dnom (4.1) na otvorenú hydrolyzu (5.3.2.3) alebo

▼B

- 250 banky s guľatým dnom (4.1), ak sa vyžaduje nízka koncentrácia sodíka (5.3.3.1), alebo
- 100 ml fľaše so skrutkovým uzáverom (4.2) (na uzavretú hydrolýzu 5.3.2.4).

Navážené množstvo vzorky musí mať obsah dusíka približne 10 mg a obsah vlhkosti nesmie presahovať 100 mg.

Vložte banku/fľašu do ľadového vodného kúpeľa a ochladte na 0 °C, pridajte 5 ml oxidačnej zmesi (3.23) a premiešajte sklenenou špachtľou s ohnutým hrotom. Utesnite banku/fľašu, v ktorej je špachtľa, vzduchotesnou fóliou, vložte ľadový vodný kúpeľ s utesenou nádobou do chladničky pri teplote 0 °C a nechajte pôsobiť 16 hodín. Po 16 hodinách vyberte z chladničky a rozložte prebytok oxidačného činidla pridaním 0,84 g disiričitanu sodného (3.4).

Prejdite k bodu 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolýza

5.3.2.1. *Hydrolýza oxidovaných vzoriek*

K oxidovanej vzorke pripravenej podľa 5.3.1 pridajte 25 ml hydrolyzačnej zmesi (3.20), pričom pozorne zmyte všetky zvyšky vzorky, ktoré sa držia na stranách nádoby a špachtle.

V závislosti od použitého postupu hydrolýzy postupujte podľa 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

5.3.2.2. *Hydrolýza neoxidovaných vzoriek*

Navážte do 100 ml alebo 250 ml banky s guľatým dnom (4.1) alebo do 100 ml fľaše so skrutkovým uzáverom (4.2) 0,1 až 1 g pripravenej vzorky (5.1) s presnosťou na 0,2 mg. Navážené množstvo vzorky musí mať obsah dusíka približne 10 mg. Opatrne pridajte 25 ml hydrolyzačnej zmesi (3.20) a zmiešajte so vzorkou. Postupujte podľa bodu 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

5.3.2.3. *Otvorená hydrolýza*

Pridajte 3 sklenené guľôčky k zmesi v banke (pripravenej v súlade s bodom 5.3.2.1 alebo 5.3.2.2) a varte pri stálom prebublávaní s refluxom 23 hodín. Po dokončení hydrolýzy chladič umyte 5 ml v citranového tlmivého roztoku (3.24). Odpojte banku a ochladte v ľadovom kúpeli.

Postupujte podľa bodu 5.3.3.

5.3.2.4. *Uzavretá hydrolýza*

Vložte fľašu s obsahom zmesi pripravenej v súlade s bodom 5.3.2.1 alebo 5.3.2.2 do sušiarne (4.3) pri teplote 110 °C. Počas prvej hodiny len položte na vrch nádoby skrutkový uzáver, aby ste predišli vytvoreniu tlaku (v dôsledku vytvárania plyných látok) a zabránili výbuchu. Nezatvárajte nádobu uzáverom. Po hodine uzatvorte nádobu uzáverom a nechajte na 23 hodín v sušiarne (4.3). Po ukončení hydrolýzy vyberte fľašu zo sušiarne, opatrne otvorte uzáver fľaše a vložte ju do ľadového vodného kúpeľa. Nechajte vychladnúť.

V závislosti od postupu na úpravu pH (5.3.3) preneste kvantitatívne obsah fľaše do 250 ml kadičky alebo 250 ml alebo 250 ml banky s guľatým dnom s použitím citranového tlmivého roztoku (3.24).

Postupujte podľa bodu 5.3.3.

▼B**5.3.3. Úprava pH**

V závislosti od tolerancie analyzátora aminokyselín (4.9) voči sodíku postupujte pri úprave pH podľa bodov 5.3.3.1 alebo 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Chromatografické systémy (4.9) vyžadujúce nízku koncentráciu sodíka.*

Pri použití analyzátora, ktorý vyžaduje nízku koncentráciu sodíka (keď sa musí znížiť objem kyseliny), sa odporúča použiť zásobný roztok vnútorného štandardu (3.27.3).

V takomto prípade pridajte k hydrolyzátu pred odparovaním 2,00 ml zásobného roztoku vnútorného štandardu (3.27.3).

Pridajte 2 kvapky 1-oktanolu (3.15) k hydrolyzátu získanému podľa ods. 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

Použitím rotačnej odparky (4.7) znížte objem na 5 – 10 ml vo vákuu pri teplote 40 °C. Ak sa objem náhodou zníži na menej ako 5 ml, hydrolyzát sa musí znehodnotiť a analýza opakovať.

Upravte pH na 2,20 s roztokom hydroxidu sodného (3.18) a postupujte ďalej podľa odseku 5.3.4.

5.3.3.2. *Pre všetky ostatné analyzátory aminokyselín (4.9)*

Vezmite hydrolyzáty získané podľa bodov 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4 a čiastočne ich zneutralizujte opatrným pridávaním za miešania 17 ml roztoku hydroxidu sodného (3.17), pričom je potrebné zabezpečiť, aby sa teplota udržala pod 40 °C.

Upravte pH na 2,20 pri izbovej teplote použitím roztoku hydroxidu sodného (3.17) a nakoniec roztoku hydroxidu sodného (3.18). Postupujte ďalej podľa bodu 5.3.4.

5.3.4. Roztok vzorky na chromatografiu

Kvantitatívne prenesť hydrolyzát s upraveným pH (5.3.3.1 alebo 5.3.3.2) s citranovým tlmivým roztokom (3.24) do 200 ml odmernej banky a doplniť po značku tlmivým roztokom (3.24).

Ak ešte nebol použitý vnútorný štandard, pridajte 2,00 ml vnútorného štandardu (3.27.3) a doplniť po značku citranovým tlmivým roztokom (3.24). Dôkladne premiešajte.

Pristúpte ďalej ku chromatografii (5.4).

Ak sa roztoky vzorky neanalyzujú v ten istý deň, musia sa uskladniť pri teplote pod 5 °C.

5.4. *Chromatografia*

Pred chromatografiou upravte teplotu extraktu (5.2) alebo hydrolyzátu (5.3.4) na laboratórnu teplotu. Zmes potrepte a prefiltrujte vhodné množstvo cez 0,22 µm membránový filter (4.5). Výsledný číry roztok sa podrobí iónovo-výmennej chromatografii s použitím analyzátora aminokyselín (4.9).

Nastreknutie sa môže vykonať manuálne alebo automaticky. Dôležité je, aby sa na kolónu nadávkovalo rovnaké analyzované množstvo roztoku štandardov a vzoriek s odchýlkou $\pm 0,5$ % s výnimkou prípadov používania vnútorného štandardu a aby boli pomery sodíka a aminokyselín v roztokoch štandardu a vzorky v najvyššej možnej miere podobné.

▼B

Vo všeobecnosti závisí frekvencia kalibrácií od stability ninhydrínového činidla a analytického systému. Štandard alebo vzorka sa rozriedi s citranovým tlmivým roztokom (3.24) tak, aby plocha píku štandardu predstavovala 30 – 200 % plochy píku aminokyseliny vzorky.

Chromatografia aminokyselín sa mierne odlišuje podľa typu použitého analyzátora a použitej živice. Zvolený systém musí byť schopný oddeliť aminokyseliny navzájom, ako aj od iných ninhydrín-pozitívnych materiálov. V pracovnom rozsahu musí chromatografický systém poskytnúť lineárnu odozvu na zmeny v množstvách aminokyselín pridaných do kolóny.

Počas chromatografie, keď sa analyzuje ekvimolárny roztok (aminokyselín, ktoré sa stanovujú), sa uplatňujú pomery výšky údolia k výške píku, ako sa uvádza nižšie. Tento ekvimolárny roztok musí obsahovať najmenej 30 % maximálneho množstva každej aminokyseliny, ktorá sa dá presne odmerať pomocou systému analyzátora aminokyselín (4.9).

Pri oddeľovaní treonínu od serínu výška údolia k výške píku u nižšej z dvoch prekrývajúcich sa aminokyselín na chromatograme nesmie prekročiť pomer 2 : 10 (ak sa stanovuje len cystín, cysteín, metionín, treonín a lysín, nedostatočné oddelenie od susedných píkuv nepriaznivo ovplyvní proces stanovenia). Pri všetkých ostatných aminokyselinách musí byť oddelenie v pomere lepšom ako 1 : 10.

Systém musí zabezpečiť, aby sa lyzín oddelil od „lyzínových artefaktov“ a od ornitínu.

6. Výpočet výsledkov

Plochy píkuv vzorky a štandardu sa merajú pre každú jednotlivú aminokyselinu a vypočíta sa množstvo (X) v g aminokyselín na kg vzorky.

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

Ak sa použije vnútorný štandard, vynásobte: $\frac{D}{C}$

- A = plocha píku, hydrolyzátu alebo extraktu,
- B = plocha píku, kalibračný štandardný roztok,
- C = plocha píku, vnútorný štandard v hydrolyzáte alebo extrakte,
- D = plocha píku, vnútorný štandard, kalibračný štandardný roztok,
- M = molekulová hmotnosť aminokyseliny, ktorá sa stanovuje,
- c = koncentrácia štandardu v $\mu\text{mol/ml}$,
- m = hmotnosť vzorky (g) (upravená na pôvodnú hmotnosť ak je sušená alebo odtučená),
- V = celkový hydrolyzáť v ml (5.3.4) alebo vypočítaný objem celkového zriedenia extraktu (6.1).

Cystín a cysteín sa obidva stanovujú ako kyselina cysteová v hydrolyzátoch oxidovanej vzorky, no vypočítajú sa ako cystín ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) pomocou M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

Metionín sa stanovuje ako metionín sulfón v hydrolyzátoch oxidovanej vzorky, no vypočíta sa ako metionín pomocou M metionínu: 149,21 g/mol.

▼B

Pridaný voľný metionín sa stanovuje po extrakcii ako metionín a výpočet sa vykoná pomocou toho istého MW.

- 6.1. Celkový objem zriedených extraktov (F) na stanovenie voľných aminokyselín (5.2) sa vypočíta takto:

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

V = objem konečného extraktu

7. **Hodnotenie metódy**

Metóda bola testovaná v rámci vzájomného porovnávania na medzinárodnej úrovni v roku 1990 pomocou štyroch rôznych krmív (krmná zmes pre ošipané, krmná zmes pre brojlerov, bielkovinový koncentrát, premix). Výsledky priemeru a smerodajnej odchýlky po eliminácii odľahlých hodnôt sú uvedené v tabuľkách v tomto bode:

Priemery v g/kg

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmná zmes pre ošipané	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Krmná zmes pre brojlerov	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Bielkovinový koncentrát	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premix	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = počet zúčastnených laboratórií

7.1. *Opakovateľnosť*

Opakovateľnosť vyjadrená ako „vnútrolaboratórna smerodajná odchýlka“ uvedeného vzájomného porovnávania je uvedená v nasledujúcich tabuľkách:

Vnútrolaboratórna smerodajná odchýlka (S_r) v g/kg

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmná zmes pre ošipané	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Krmná zmes pre brojlerov	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Bielkovinový koncentrát	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premix	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = počet zúčastnených laboratórií

▼ **B****Variačný koeficient (%) vnútrolaboratórnej smerodajnej odchýlky (S_r)**

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmná zmes pre ošípané	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Krmná zmes pre brojlery	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Bielkovinový koncentrát	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premix	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = počet zúčastnených laboratórií

7.2. *Reprodukovateľnosť*

Výsledky medzilaboratórnej smerodajnej odchýlky na základe uvedeného vzájomného porovnávania sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách:

Medzilaboratórna smerodajná odchýlka (S_R) v g/kg

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmná zmes pre ošípané	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Krmná zmes pre brojlery	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Bielkovinový koncentrát	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premix	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = počet zúčastnených laboratórií

Variačný koeficient (%) medzilaboratórnej smerodajnej odchýlky (S_R)

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmná zmes pre ošípané	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Krmná zmes pre brojlery	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Bielkovinový koncentrát	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premix	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = počet zúčastnených laboratórií

▼ B**8. Využitie referenčných materiálov**

Správne uplatňovanie tejto metódy sa overí vykonaním opakovaných meraní certifikovaných referenčných materiálov, ak sú takéto materiály k dispozícii. Odporúča sa kalibrácia certifikovaným kalibračným roztokom aminokyselín.

9. Poznámky

- 9.1. V dôsledku rozdielov medzi analyzátormi aminokyselín sa berú za základ konečné koncentrácie kalibračných roztokov štandardných aminokyselín (pozri body 3.27.4 a 3.27.5) a hydrolyzáta (pozri 5.3.4).

Rozsah lineárnej odozvy prístroja sa musí preveriť pre všetky aminokyseliny.

Štandardný roztok sa zriedi s citranovým tlmivým roztokom tak, aby plochy píkov boli v strede rozsahu.

- 9.2. V prípade použitia zariadenia na vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu na analýzu hydrolyzáto sa musia optimalizovať experimentálne podmienky v súlade s odporúčaniami výrobcu.

- 9.3. Uplatňovaním tejto metódy na krmivá s obsahom viac ako 1 % chloridu (koncentrát, minerálne krmivá, doplnkové krmivá) môže dôjsť k podhodnoteniu metionínu a musí sa vykonať osobitná úprava.

G. STANOVENIE TRYPTOFÁNU**1. Účel a oblasť**

Metóda umožňuje stanovenie celkového a voľného tryptofánu v krmivách. Nerozlišuje medzi D a L formami.

2. Podstata metódy

Na stanovenie celkového tryptofánu sa vzorka hydrolyzuje v alkalickom prostredí s nasýteným roztokom hydroxidu bárnateho a zahreje sa na 110 °C na 20 hodín. Po hydrolyze sa pridá vnútorný štandard.

Na stanovenie voľného tryptofánu sa vzorka extrahuje v mierne kyslom prostredí v prítomnosti vnútorného štandardu.

Tryptofán a vnútorný štandard v hydrolyzáte alebo v extrakte sa stanovujú pomocou HPLC s fluorescenčnou detekciou.

3. Chemikálie

- 3.1. Musí sa použiť dvakrát destilovaná voda alebo voda rovnakej kvality (vodivosť < 10 µS/cm).
- 3.2. Štandardná látka: tryptofán (čistota/obsah ≥ 99 %) vysušený vo vákuu nad oxidom fosforečným.
- 3.3. Vnútorný štandard: α-metyl-tryptofán (čistota/obsah ≥ 99 %) vysušený vo vákuu nad oxidom fosforečným.
- 3.4. Oktahydrát hydroxidu bárnateho Ba(OH)₂·8H₂O (ktorý sa nesmie nechať dlho na vzduchu, aby sa nevytváral BaCO₃, ktorý môže narušiť proces stanovenia) (pozri poznámku 9.3).
- 3.5. Hydroxid sodný.
- 3.6. Kyselina orto-fosforečná, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, čistoty HPLC.
- 3.9. Petroléter, rozpätie bodu varu 40 – 60 °C.

▼B

- 3.10. Roztok hydroxidu sodného $c = 1 \text{ mol/l}$:
Rozpusťte 40,0 g NaOH (3.5) vo vode a objem doplňte vodou na 1 liter (3.1).
- 3.11. Kyselina chlorovodíková, $c = 6 \text{ mol/l}$:
Vezmite 492 ml HCl (3.7) a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.12. Kyselina chlorovodíková, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Vezmite 82 ml HCl (3.7) a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.13. Kyselina chlorovodíková, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Vezmite 8,2 ml HCl (3.7) a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.14. Kyselina orto-fosforečná, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
Vezmite 34 ml kyseliny orto-fosforečnej (3.6) a objem doplňte vodou na 1 liter (3.1).
- 3.15. Koncentrovaný roztok tryptofánu (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
V 500 ml odmernej banke rozpustíte 0,2553 g tryptofánu (3.2) v kyseline chlorovodíkovej (3.13) a doplňte kyselinou chlorovodíkovou (3.13) po značku. Skladujte pri teplote $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálne 4 týždne.
- 3.16. Koncentrovaný roztok vnútorného štandardu, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
V 500 ml odmernej banke rozpustíte 0,2728 g α -metyl-tryptofánu (3.3) v kyseline chlorovodíkovej (3.13) a doplňte kyselinou chlorovodíkovou (3.13) po značku. Skladujte pri teplote $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálne 4 týždne.
- 3.17. Kalibračný štandardný roztok tryptofánu a vnútorného štandardu:
Vezmite 2,00 ml koncentrovaného roztoku tryptofánu (3.15) a 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (α -metyl-tryptofán) (3.16). Rozriedte s vodou (3.1) a metanolom (3.8) na približne rovnaký objem a na približne rovnakú koncentráciu metanolu (10 – 30 %) ako hotový hydrolyzát.

Tento roztok sa musí pripraviť tesne pred použitím.

Počas prípravy chráňte ho pred priamym slnečným svetlom.
- 3.18. Kyselina octová
- 3.19. 1,1,1-trichloro-2-metyl-2-propanol
- 3.20. Etanolamín w (w/w) > 98 %.
- 3.21. Roztok 1 g 1,1,1-trichloro-2-metyl-2-propanolu (3.19) v 100 ml metanolu (3.8).
- 3.22. Mobilná fáza pre HPLC: 3,00 g kyseliny octovej (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1,1-trichloro-2-metyl-2-propanolu (3.19) v metanole (3.8) (1g/100ml). Upravte pH na 5,00 pomocou etanolamínu (3.20). Objem doplňte vodou (3.1) na 1 000 ml.
- 4. Prístrojové vybavenie**
- 4.1. Zariadenie HPLC s fluorescenčným detektorom.
- 4.2. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 125 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 3 μm alebo ekvivalentná
- 4.3. pH meter.
- 4.4. Polypropylénová banka, objem 125 ml so širokým hrdlom a závitovým uzáverom.

▼B

- 4.5. Membránový filter, 0,45 µm.
- 4.6. Autokláv, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Mechanická trepačka alebo magnetická miešačka.
- 4.8. Vírivý mixér.

5. Postup**5.1. *Príprava vzoriek***

Vzorka sa pomelie tak, aby prepadla cez sito o veľkosti ôk 0,5 mm. Vzorky s vysokým obsahom vlhkosti sa pred mletím musia vysušiť buď vzduchom pri teplote do 50 °C, alebo lyofilizáciou. Vzorky s vysokým obsahom tuku sa pred mletím extrahujú petroléterom (3.9).

5.2. *Stanovenie voľného tryptofánu (extrakt)*

Navážte s presnosťou na 1 mg primerané množstvo (1 – 5 g) pripravenej vzorky (5.1) do Erlenmayerovej banky. Pridajte 100,0 ml kyseliny chlorovodíkovej, (3.13) a 5,00 ml koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (3.16). Zmes trepte alebo miešajte 60 min. na mechanickej trepačke alebo na magnetickej miešačke (4.7). Nechajte sediment usadiť a napipetujte 10,0 ml z roztoku nad sedimentom do kadičky. Pridajte 5 ml kyseliny orto-fosforečnej (3.14). Upravte pH na 3 pomocou hydroxidu sodného (3.10). Pridajte dostatočné množstvo metanolu (3.8) na dosiahnutie koncentrácie medzi 10 a 30 % metanolu v konečnom objeme. Preneste do odmernej banky primeraného objemu a rozriedte s vodou na objem potrebný na chromatografiu [približne rovnaký objem ako je objem kalibračného štandardného roztoku (3.17)].

Prefiltrujte niekoľko ml roztoku cez 0,45 µm membránový filter (4.5) pred nástrekom na HPLC kolónu. Pokračujte ďalším krokom chromatografie podľa odseku 5.4.

Roztok štandardu a extrakty chráňte pred priamym slnečným svetlom. Ak nie je možné analyzovať extrakty v ten istý deň, môžu sa uskladniť pri teplote 5 °C maximálne počas 3 dní.

5.3. *Stanovenie celkového tryptofánu (hydrolyzát)*

Navážte s presnosťou na 0,2 mg od 0,1 do 1 g pripravenej vzorky (5.1) do polypropylénovej banky (4.4). Navážka vzorky má obsahovať približne 10 mg dusíka. Pridajte 8,4 g oktahydrátu hydroxidu bárnateho (3.4) a 10 ml vody. Premiešajte vo vírivom mixéri (4.8) alebo na magnetickej miešačke (4.7). Magnet potiahnutý teflónom ponechajte v zmesi. Steny nádoby opláchnite 4 ml vody. Položte na ňu skrutkový uzáver a voľne banku uzatvorte. Preneste do autoklávu (4.6) s vriacou vodou a nechajte v pare 30 – 60 minút. Uzatvorte autokláv a autoklávujte 20 hodín pri 110 (± 2) °C.

Pred otvorením autoklávu znížte teplotu na hodnotu tesne pod 100 °C. K teplej zmesi pridajte 30 ml vody laboratórnej teploty, aby ste sa vyhli kryštalizácii Ba(OH)₂·8 H₂O. Jemne potrepte alebo premiešajte. Pridajte 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (α-metyl-tryptofán) (3.16). Nechajte nádobu 15 minút ochladzovať vo vodnom/ládovom kúpeli.

Potom pridajte 5 ml kyseliny orto-fosforečnej (3.14). Nádobu nechajte v chladiacom kúpeli a neutralizujte pomocou HCl (3.11) za stáleho miešania a upravte pH na 3,0 pomocou HCl (3.12). Pridajte dostatočné množstvo metanolu na dosiahnutie koncentrácie medzi 10 a 30 % metanolu v konečnom objeme. Preneste do odmernej banky primeraného objemu a zriedte s vodou, aby sa dosiahol stanovený objem potrebný na chromatografiu (napr. 100 ml). Pridanie metanolu nesmie spôsobiť vyzrážanie.

▼ B

Prefiltrujte niekoľko ml roztoku cez 0,45 µm membránový filter (4.5) pred nástrekom na HPLC kolónu. Ďalším krokom je chromatografia podľa odseku 5.4.

Roztok štandardu a hydrolyzáty chráňte pred priamym slnečným svetlom. Ak nie je možné analyzovať hydrolyzáty v ten istý deň, môžu sa uskladniť pri teplote 5 °C maximálne počas 3 dní.

5.4. Stanovenie HPLC

Na usmernenie sú k dispozícii tieto podmienky pre izokratické eluovanie; môžu sa uplatniť iné podmienky, ak poskytujú rovnaké výsledky (pozri poznámky 9.1 a 9.2):

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu	kolóna	125 mm × 4 mm, s náplňou C ₁₈ , 3 µm alebo ekvivalentná (4.2):
Teplota kolóny:		laboratórna teplota
Mobilná fáza (3.22):		3,00 g kyseliny octovej (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1-trichloro-2-metyl-2-propanolu (3.19) v metanole (3.8) (1 g/100 ml). Upravte pH na 5,00 pomocou tanolamínu (3.20). Doplnite objem vodou (3.1) na 1 000 ml
Prietoková rýchlosť:		1 ml/min.
Celkový čas analýzy:		približne 34 min.
Detekčná vlnová dĺžka:		excitácia: 280 nm, emisia: 356 nm
Vstrekový objem		20 µl

6. Výpočet výsledkov

Množstvo tryptofánu (X) v g na 100 vzorky sa vypočíta podľa vzorca:

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

- A = plocha píku vnútorného štandardu, kalibračného štandardného roztoku (3.17),
 B = plocha píku extraktu tryptofánu (5.2) alebo hydrolyzátu (5.3),
 V₁ = objem v ml (2 ml) koncentrovaného roztoku tryptofánu (3.15) pridaného do kalibračného roztoku (3.17),
 c = koncentrácia v µmol/ml (= 2,50) koncentrovaného roztoku tryptofánu (3.15) pridaného do kalibračného roztoku (3.17),
 V₂ = objem v ml koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (3.16) pridaného pri extrakcii (5.2) (= 5,00 ml) alebo k hydrolyzátu (5.3) (= 2,00 ml),
 C = plocha píku vnútorného štandardu, extraktu (5.2) alebo hydrolyzátu (5.3),
 D = plocha píku tryptofánu, kalibračného štandardného roztoku (3.17),
 V₃ = objem v ml (= 2,00 ml) koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (3.16) pridaného do kalibračného štandardného roztoku (3.17),
 m = hmotnosť vzorky v g (upravená na pôvodnú hmotnosť, ak je sušená a/alebo odtučnená),
 M = molekulová hmotnosť tryptofánu (= 204,23 g/mol).

7. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych z vyššej hodnoty.

▼B

8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie

Zorganizovala sa medzilaboratórna štúdia ES (4. vzájomné porovnanie), v ktorej sa analyzovali tri vzorky až v 12 laboratóriách na overenie metódy pre hydrolýzu. Každá vzorka sa analyzovala 5 krát. Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

	Vzorka 1 Krmivo pre ošípané	Vzorka 2 Krmivo pre ošípané doplnené L-tryptofánom	Vzorka 3 Koncentrát krmiva pre ošípané
L	12	12	12
n	50	55	50
Priemery [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 = počet laboratórií, ktoré poskytli výsledky,
n = počet jednotlivých výsledkov, ktoré zostali po eliminácii odľahlých hodnôt (určené Cochranovým, Dixonovým testom na odľahlé hodnoty),
s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti,
S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti,
r = opakovateľnosť,
R = reprodukovateľnosť,
CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %,
CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %.

Zorganizovala sa ďalšia medzilaboratórna štúdia ES (3. vzájomné porovnanie), v ktorej sa analyzovali dve vzorky až v 13 laboratóriách na overenie metódy pre extrakciu voľného tryptofánu. Každá vzorka sa analyzovala 5 krát. Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

	Vzorka 4 Zmesi pšenice a sóje	Vzorka 5 Zmes pšenice a sóje (= vzorka 4) s pridaným tryptofánom (0,457g/kg)
L	12	12
n	55	60
Priemer [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 = počet laboratórií, ktoré poskytli výsledky,
n = počet jednotlivých výsledkov, ktoré zostali po eliminácii odľahlých hodnôt (určené Cochranovým, Dixonovým testom na odľahlé hodnoty),
s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti,
S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti,
r = opakovateľnosť,
R = reprodukovateľnosť,
CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %,
CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %.

▼B

Zorganizovala sa ďalšia štúdia ES vzájomného porovnania, v ktorej sa analyzovali štyri vzorky až v 7 laboratóriách s cieľom osvedčiť tryptofán pre hydrolyzu. Výsledky sú uvedené nižšie. Každá vzorka sa analyzovala 5 krát.

	Vzorka 1 Krmná zmes pre ošípané (CRM 117)	Vzorka 2 Rybia múčka s nízkym obsahom tuku (CRM 118)	Vzorka 3 Sójová múčka (CRM 119)	Vzorka 4 Sušené odstredené mlieko (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Priemer [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 = počet laboratórií, ktoré poskytli výsledky,
n = počet jednotlivých výsledkov, ktoré zostali po eliminácii odľahlých hodnôt (určené Cochranovým, Dixonovým testom na odľahlé hodnoty),
 s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti,
 S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti,
 r = opakovateľnosť,
 R = reprodukovateľnosť,
 CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %,
 CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %.

9. Poznámky

- 9.1. Dodržanie špeciálnych chromatografických podmienok môže viesť k lepšiemu oddeleniu tryptofánu od α -metyl-tryptofánu.

Izokratické eluovanie, po ktorom nasleduje gradientové čistenie kolóny:

Kolóna na kvapalinovú hromatografiu: 125 mm × 4 mm, s náplňou C_{18} , 5 μ m alebo ekvivalentná

Teplota kolóny: 32 °C

Mobilná fáza: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metanol, 95+5 (V+V).

B: metanol

Gradientový 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

Prietoková rýchlosť: 1,2 ml/min.

Celkový čas analýzy: približne 33 min.

- 9.2. Chromatografia sa mení v závislosti od typu HPLC a od použitej náplne kolóny. Zvolený systém musí umožňovať rozlíšenie na základnú čiaru medzi tryptofanom a vnútorným štandardom. Okrem toho je dôležité, aby sa produkty degradácie dobre oddelili od tryptofánu a vnútorného

▼B

štandardu. Hydrolyzáty bez vnútorného štandardu sa musia analyzovať na kontrolu základnej čiary pod vnútorným štandardom na prítomnosť nečistôt. Je dôležité, aby bol čas analýzy dostatočne dlhý na elúciu všetkých produktov degradácie, inak môžu oneskorene eluujúce píky interferovať s nasledujúcim chromatografickým dejom.

V pracovnom rozsahu chromatografický systém má dávať lineárnu odozvu. Lineárna odozva sa meria konštantnou (bežnou) koncentráciou vnútorného štandardu a meniacimi sa koncentraciami tryptofánu. Je dôležité, aby rozmery oboch píkov tryptofánu aj vnútorného štandardu spadali do lineárneho rozsahu HPLC/fluorescenčného systému. Ak je jeden z píkovek – tryptofánu a/alebo vnútorného štandardu – príliš malý alebo príliš veľký, analýzu treba zopakovať s inou navážkou vzorky a/alebo so zmeneným konečným objemom.

9.3. *Hydroxidy bárnatý*

Čím je hydroxid bárnatý starší, tým sa ťažšie rozpúšťa. Výsledkom je nečíry roztok na stanovenie HPLC, ktorý môže viesť k nízkym výsledným hodnotám tryptofánu.

H. STANOVENIE OLEJOV A TUKOV

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda je určená na stanovenie olejov a tukov v krmivách. Nevzťahuje sa na analýzu olejnatých semien a olejnatých plodov.

Použitie týchto dvoch nižšie uvedených postupov závisí od charakteru a zloženia krmív a dôvodu, prečo sa analýza vykonáva.

1.1. *Postup A – priamo extrahovateľné oleje a tuky*

Táto metóda sa uplatňuje na krmné suroviny rastlinného pôvodu okrem tých, na ktoré sa vzťahuje postup B.

1.2. *Postup B – celkové oleje a tuky*

Táto metóda sa uplatňuje na krmné suroviny živočíšneho pôvodu a na všetky krmné zmesi. Používa sa aj pri všetkých materiáloch, z ktorých sa oleje a tuky nedajú úplne vyextrahovať bez predchádzajúcej hydrolyzy (napr. glutény, kvasnice, zemiakové bielkoviny a produkty, ktoré boli spracované postupom ako extrúzia, vložkovanie a zahrievanie).

1.3. *Interpretácia výsledkov*

Vo všetkých prípadoch, keď sa postupom B dosiahne vyšší výsledok ako postupom A, sa za správnu hodnotu považuje výsledok získaný postupom B.

2. **Podstata metódy**

2.1. *Postup A*

Vzorka sa extrahuje petroléterom. Rozpúšťadlo sa oddestiluje a zvyšok sa vysuší a odváži.

2.2. *Postup B*

Vzorka sa upravuje kyselinou chlorovodíkovou za varu. Zmes sa ochladí a prefiltruje. Zvyšok sa premýva a vysuší a postúpi na stanovenie podľa postupu A.

▼B**3. Chemikálie**

- 3.1. Petroléter, rozpätie bodu varu: 40 až 60 °C. Hodnota brómového čísla musí byť nižšia ako 1 a zvyšok po odparení menej ako 2 mg/100 ml.
- 3.2. Síran sodný, bezvodý.
- 3.3. Kyselina chlorovodíková, $c = 3 \text{ mol/l}$
- 3.4. Filtračná pomôcka, napr. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Prístroj na extrakciu. Ak je vybavený sifónom (Soxhletov prístroj), prietoková rýchlosť musí byť taká, aby vykazovala 10 cyklov za hodinu; ak ide o zariadenie bez sifónu, prietoková rýchlosť musí byť 10 ml za minútu.
- 4.2. Extrakčné patróny, ktoré neobsahujú látky rozpustné v petroléteri a ktoré majú priepustnosť v súlade s požiadavkami bodu 4.1.
- 4.3. Sušiareň, buď vákuová nastavená na $75 \pm 3 \text{ °C}$, alebo vzduchová nastavená na $100 \pm 3 \text{ °C}$.

5. Postup**5.1. Postup A (pozri bod 8.1)**

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg, preneste ju do extrakčnej patróny (4.2) a prikryte kúskom beztukovej vaty.

Vložte patrónu do extraktora (4.1) a extrahujte šesť hodín petroléterom (3.1). Zachyťte extrakt petroléteri v suchej odváženej banke s obsahom zrníčok pemzy ⁽¹⁾.

Oddestilujte rozpúšťadlo. Sušte zvyšok, ktorý zostal v banke, jeden a pol hodiny v sušiarňi (4.3). Nechajte vychladnúť v exsikátore a odvážte. Opäť sušte 30 minút, čím sa zabezpečí, že hmotnosť olejov a tukov zostane konštantná (strata hmotnosti medzi dvomi po sebe nasledujúcimi váženiami musí byť menšia alebo rovná 1 mg).

5.2. Postup B

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg (pozri bod 8.2), vložte do 400 ml kadičky alebo do 300 ml Erlenmayerovej banky a pridajte 100 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.3) a zrníčka pemzy. Kadičku prikryte hodinovým sklíčkom alebo na Erlenmayerovu banku nasadte spätný chladič. Uvedte zmes do mierneho varu na slabom ohni alebo vyhrievacej platni a varte jednu hodinu. Zabráňte prilepeniu vzorky na steny nádoby.

Ochladte a pridajte také množstvo filtračnej pomôcky (3.4), ktoré bude dostatočné na zabránenie akýmkoľvek stratám oleja a tuku počas filtrácie. Prefiltrujte cez navlhčený, beztukový, dvojité filtračný papier. Zvyšok premývajte studenou vodou, kým nezískate neutrálny filtrát. Skontrolujte, či filtrát neobsahuje oleje a tuky. Ich prítomnosť znamená, že sa vzorka pred hydrolýzou musí extrahovať petroléterom podľa postupu A.

Položte dvojité filtračný papier obsahujúci zvyšok na hodinové sklíčko a sušte jeden a pol hodiny vo vzduchovej sušiarňi (4.3) pri teplote $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

⁽¹⁾ V prípade, že olej musí byť následne podrobený testovaniu, nahradte fragmenty pemzového kameňa sklenenými guľôčkami.

▼B

Vložte dvojité filtračný papier obsahujúci suché zvyšky do extrakčnej patróny (4.2) a prikryte kúskom beztukovej vaty. Patrónu vložte do extraktora (4.1) a postupujte tak, ako je uvedené v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

6. **Vyjadrenie výsledkov**

Vyjadrite hmotnosť zvyšku ako percento zo vzorky.

7. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení uskutočnených z tej istej vzorky tým istým analytikom nesmie presiahnuť:

- 0,2 % v absolútnej hodnote pre obsahy olejov a tukov pod 5 %,
- 4,0 % relatívnych z hodnoty vyššieho výsledku pri obsahoch od 5 do 10 %,
- 0,4 % v absolútnej hodnote pre obsahy nad 10 %.

8. **Poznámky**

- 8.1. Pri produktoch s vysokým obsahom olejov a tukov, ktoré sa obtiažne drvia alebo sú nevhodné na získanie homogénnej redukovanej skúšobnej vzorky, postupujte podľa tohto postupu:

Navážte 20 g vzorky s presnosťou na 1 mg a zmiešajte s 10 alebo viac gramami bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahujte petroléterom (3.1) podľa bodu 5.1. Získaný extrakt doplňte na 500 ml petroléterom (3.1) a premiešajte. Odoberte 50 ml roztoku a vložte do malej, suchej, odváženej banky obsahujúcej zrníčka pemzy. Rozpúšťadlo oddestilujte, vysušte a postupujte spôsobom uvedeným v poslednom odseku bodu 5.1.

Odstráňte rozpúšťadlo z extrakčného zvyšku, ktorý zostal v patrónke, zvyšok rozdrvte na jemnosť 1 mm, vráťte do extrakčnej patróny (nepri-dávajte síran sodný) a postupujte spôsobom uvedeným v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

Vypočítajte obsah olejov a tukov ako percento vzorky s pomocou tohto vzorca:

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

kde:

m_1 = hmotnosť zvyšku v gramoch po prvej extrakcii (aliquotná časť extraktu),

m_2 = hmotnosť zvyšku v gramoch po druhej extrakcii.

- 8.2. V prípade produktov s nízkym obsahom olejov a tukov sa môže množstvo skúšobnej vzorky zvýšiť na 5 g.
- 8.3. V prípade krmív pre spoločenské zvieratá s vysokým obsahom vody sa môže stať, že ich bude treba zmiešať s bezvodým síranom sodným ešte pred hydrolýzou a extrakciou podľa postupu B.
- 8.4. V odseku 5.2 môže byť na premytie zvyšku po filtrácii efektívnejšie použiť horúcu vodu namiesto studenej.
- 8.5. V prípade niektorých krmív môže byť potrebné 1,5 hodinovú dobu sušenia predĺžiť. Vyhnite sa nadmernému sušeniu, keďže to môže viesť k nízkym výsledným hodnotám. Je možné použiť aj mikrovlnnú rúru.

▼B

- 8.6. Ak je obsah oleja/tuku vyšší ako 15 %, tak sa odporúča predbežná extrakcia podľa postupu A pred hydrolýzou a reextrakcia podľa postupu B. Závisí to do určitej miery od charakteru krmiva a od charakteru oleja/tuku v krmive.

I. STANOVENIE VLÁKNINY**1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť beztukové organické látky v krmivách, ktoré sú nerozpustné v kyslom a zásaditom prostredí a bežne sa označujú ako vlákna.

2. Podstata metódy

Vzorka, v prípade potreby odtučnená, sa postupne rozkladá vriacimi roztokmi kyseliny sírovej a hydroxidu draselného v predpísaných koncentráciách. Zvyšok sa oddelí filtráciou na sklenenej fritě, premyje, vysuší, odváži a spopolní pri teplote 475 až 500 °C. Úbytok hmotnosti v dôsledku spopolnenia zodpovedá vláknu prítomnej v skúšobnej vzorke.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina sírová, $c = 0,13 \text{ mol/l}$
- 3.2. Protipeniace činidlo (napr. n-oktanol)
- 3.3. Filtračná pomôcka (Celit 545 alebo ekvivalentná) žihaná 4 hodiny pri teplote 500 °C (8.6)
- 3.4. Acetón
- 3.5. Petroléter s rozpätím bodu varu od 40 do 60 °C
- 3.6. Kyselina chlorovodíková, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7. Roztok hydroxidu draselného $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Vyhrievacia jednotka určená na rozklad kyselinou sírovou a roztokom hydroxidu draselného vybavená držiakom na filtračný téglik (4.2) a výstupnou rúrkou s kohútom na vypustenie kvapaliny a vákua, podľa možnosti so stlačeným vzduchom. Pred použitím jednotku každý deň predhrievajte vriacou vodou počas piatich minút.
- 4.2. Sklenený filtračný téglik so sklenenou filtračnou fritou s veľkosťou pórov 40 – 90 μm . Pred prvým použitím žihajte niekoľko minút pri teplote 500 °C a nechajte vychladnúť (8.6).
- 4.3. Valec s objemom najmenej 270 ml so spätným chladičom, vhodný na varenie.
- 4.4. Sušiareň s termostatom.
- 4.5. Muflová pec s termostatom.
- 4.6. Extrakčná jednotka s podpornou platňou na filtračný téglik (4.2) a vypúšťacím potrubím s kohútom na uvoľňovanie vákua a vypúšťanie kvapaliny.
- 4.7. Spojovacie krúžky na spájanie vyhrievacej jednotky (4.1), téglika (4.2) a valca (4.3) a na pripojenie jednotky na extrakciu za studena (4.6) a téglika.

5. Postup

Navážte 1 g pripravenej vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do téglika (4.2) (pozri poznámky 8.1, 8.2 a 8.3) a pridajte 1 g filtrovacej pomôcky (3.3).

▼B

Spojte vyhrievaciu jednotku (4.1) a filtračný téglík (4.2), potom pripojte k téglíku valec (4.3). Nalejte 150 ml vriacej kyseliny sírovej (3.1) do valca spojeného s téglíkom a v prípade potreby pridajte niekoľko kvapiek protipeniaceho činidla (3.2).

Uved'te tekutinu do varu v priebehu 5 ± 2 minút a prudko varte po dobu presne 30 minút.

Otvorte kohút na vypúšťacom potrubí (4.1) a vo vákuu filtrujte kyselinu sírovú cez filtračný téglík a zvyšok premyte tromi po sebe nasledujúcimi 30 ml dávkami vriacej vody. Presvedčte sa, že zvyšok je prefiltrovaný po každom premytí dosucha.

Zatvorte výpustný kohút a nalejte 150 ml vriaceho roztoku hydroxidu draselného (3.7) do valca spojeného s téglíkom a pridajte niekoľko kvapiek protipeniaceho činidla (3.2). Uved'te tekutinu do varu v priebehu 5 ± 2 minút a prudko varte po dobu presne 30 minút. Prefiltrujte a zopakujte postup premývania použitý pri kroku s kyselinou sírovou.

Po poslednom premytí a vysušení odpojte téglík a jeho obsah a znovu pripojte k jednotke na extrakciu za studena (4.6). Vytvorte vákuum a premyte zvyšok v téglíku tromi po sebe nasledujúcimi 25 ml dávkami acetónu (3.4) a presvedčte sa, či bol zvyšok po každom premytí prefiltrovaný dosucha.

Vysušte téglík na konštantnú hmotnosť v sušiarňi pri teplote $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po každom vysušení nechajte vychladnúť v exsíkátore a rýchlo odvážte. Umiestnite téglík do muflovej pece a spopolňujte na konštantnú hmotnosť (strata hmotnosti medzi dvoma po sebe nasledujúcimi váženiami musí byť nižšia alebo rovná 2 mg) pri teplote $475\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu najmenej 30 minút.

Po každom zahriatí najskôr nechajte vychladnúť v peci a potom v exsíkátore pred vážením.

Vykonajte slepý pokus bez vzorky. Strata hmotnosti v dôsledku spopolňovania nesmie presiahnuť 4 mg.

6. Výpočet výsledkov

Obsah vláknniny ako percento vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

m = hmotnosť vzorky v g,
 m_0 = strata hmotnosti po spopolnení počas stanovenia, v g,
 m_1 = strata hmotnosti po spopolnení počas slepého pokusu, v g.

7. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi dvoma paralelnými stanoveniami vykonanými v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

- 0,6 % v absolútnej hodnote pre obsah vláknniny nižší ako 10 %,
- 6 % relatívnych z hodnoty vyššieho výsledku pre obsah vláknniny 10 % alebo vyšší ako 10 %.

8. Poznámky

- 8.1. Krmivá obsahujúce viac ako 10 % tuku sa musia pred analýzou odtučniť petroléterom (3.5). Pripojte filtračný téglík (4.2) s obsahom k jednotke na extrakciu za studena (4.6) a vytvorte vákuum, premyte zvyšok tromi

▼B

po sebe nasledujúcimi 30 ml dávkami petroléтеру, pričom sa presvedčte, či je zvyšok suchý. Pripojte téglík s obsahom k vyhrievacej jednotke (4.1) a postupujte ďalej podľa bodu 5.

- 8.2. Krmivá obsahujúce tuky, ktoré sa nedajú priamo vyextrahovať petroléterom (3.5), sa musia odtučniť postupom uvedeným v bode 8.1 a opätovne odtučniť po varení s kyselinou. Po varení s kyselinou a následnom premytí pripojte téglík s obsahom k jednotke na extrakciu za studena (4.6) a premyte tri razy 30 ml dávkami acetónu a následne tri razy 30 ml dávkami petroléтеру. Filtrujte vo vákuu do sucha a pokračujte v analýze postupom opísaným v bode 5, počnúc varom s hydroxidom draselným.
- 8.3. Ak krmivá obsahujú viac ako 5 % uhličitanov, vyjadrených ako uhličitan vápenatý, tak pripojte téglík (4.2) s naváženou vzorkou k vyhrievacej jednotke (4.1). Premyte vzorku trikrát 30 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.6). Po každom prídavku nechajte vzorku asi jednu minútu stáť predtým, ako ju prefiltrujete. Premyte jedenkrát 30 ml vody a ďalej postupujte podľa bodu 5.
- 8.4. Ak sa použije prístroj vo forme stojana (niekoľko téglíkov pripojených k tej istej vyhrievacej jednotke) v rámci tej istej sady sa nesmú vykonať dve samostatné stanovenia s použitím tej istej analyzovanej vzorky.
- 8.5. Ak je po prevarení obtiažne prefiltrovať kyslé a zásadité roztoky, použite stlačený vzduch cez vypúšťacie potrubie vyhrievacej jednotky a potom pokračujte vo filtrovaní.
- 8.6. Teplota pri spopolňovaní nemá byť vyššia ako 500 °C, aby sa predĺžila životnosť sklenených filtračných téglíkov. Je potrebné vyhnúť sa nadmernému tepelnému šoku počas cyklov zahrievania a chladenia.

J. STANOVENIE CUKROV

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie množstva redukujúcich cukrov a celkových cukrov po inverzii, vyjadrených ako glukóza, alebo v prípade, že je to vhodné, ako sacharóza, po vynásobení faktorom 0,95. Uplatňuje sa v prípade kŕmnych zmesí. Pre iné krmivá platia osobitné metódy. V prípade potreby sa laktóza stanoví oddelene a zohľadní sa pri výpočte výsledkov.

2. Podstata metódy

Cukry sa extrahujú v rozriedenom etanole; roztok sa vyčirí Carrezovými činidlami I a II. Po eliminácii etanolu sa množstvá stanovujú pred inverziou a po nej Luff-Schoorlovou metódou.

3. Chemikálie

- 3.1. Roztok etanolu 40 % (v/v) o hustote: 0,948 g/ml pri 20 °C, zneutralizovaný na indikátor fenolftaleín.
- 3.2. Carrezovo činidlo I: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu ferokyanidu draselného, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.4. Metyloranž, roztok 0,1 % (w/v).
- 3.5. Kyselina chlorovodíková 4 mol/liter.
- 3.6. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/liter.

▼B

3.7. Roztok hydroxidu sodného 0,1 mol/liter.

3.8. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného miešania nalejte roztok kyseliny citrónovej (3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.8.3). Pridajte roztok síranu meďnatého (3.8.1) a objem doplňte vodou na 1 liter. Nechajte cez noc odstáť a prefiltrujte.

Skontrolujte koncentráciu takto získaného činidla (Cu 0,05 mol/liter; Na_2CO_3 1 mol/liter), pozri (5.4) posledný odsek. Hodnota pH roztoku má byť približne 9,4.

3.8.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustite 25 g pentahydrátu síranu meďnatého $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, bez obsahu železa v 100 ml vody.

3.8.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustite 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v 50 ml vody.

3.8.3. Roztok uhličitanu sodného: rozpustite 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného v približne 300 ml teplej vody. Nechajte vychladnúť.

3.9. Roztok tiosíranu sodného 0,1 mol/liter.

3.10. Roztok škrobu: pridajte zmes 5 g škrobu rozpusteného v 30 ml vody do 1 litra vriacej vody. Varte tri minúty, nechajte vychladnúť a v prípade potreby pridajte 10 mg jodidu ortuťnatého na konzervovanie.

3.11. Kyselina sírová, 3 mol/liter.

3.12. Jodid draselný, roztok 30 % (w/v).

3.13. Granulovaná pemza vyvarená v kyseline chlorovodíkovej, premytá vodou a vysušená.

3.14. 3-metylbutan-1-ol.

4. Prístrojové vybavenie

Mixér (trepačka): približne 35 až 40 ot/min.

5. Postup

5.1. Extrakcia vzorky

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do odmernej banky s objemom 250 ml. Pridajte 200 ml etanolu (3.1) a hodinu miešajte v trepačke. Pridajte 5 ml Carrezovho činidla I (3.2) a miešajte približne 30 sekúnd. Pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.3) a miešajte približne jednu minútu. Doplnite etanolom po značku (3.1), zhomogenizujte a prefiltrujte. Napipetujte 200 ml filtrátu a odparte na približne polovičný objem, aby sa odstránilo čo najväčšie množstvo etanolu. Zvyšok po odparení kvantitatívne preneste do 200 ml odmernej banky pomocou horúcej vody, nechajte vychladnúť, doplňte po značku vodou, zhomogenizujte a v prípade potreby prefiltrujte. Roztok sa použije na stanovenie množstva redukujúcich cukrov a po inverzii na stanovenie celkových cukrov.

5.2. Stanovenie redukujúcich cukrov

Pomocou pipety odoberte najviac 25 ml roztoku obsahujúceho menej ako 60 mg redukujúcich cukrov vyjadrených ako glukóza. V prípade potreby objem doplňte destilovanou vodou na 25 ml a stanovte obsah redukujúcich cukrov Luff-Schoorlovou metódou. Výsledok sa vyjadří ako percentuálny obsah glukózy vo vzorke.

5.3. Stanovenie celkových cukrov po inverzii

Do 100 ml odmernej banky napipetujte 50 ml roztoku. Pridajte niekoľko kvapiek roztoku metyloranže (3.4), potom za stáleho miešania opatrne pridávajte kyselinu chlorovodíkovú (3.5), až do vzniku cibulového zafarbenia. Pridajte 15 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.6), banku ponorte

▼B

do kúpeľa s vriacou vodou a nechajte v ňom tridsať minút. Rýchlo ochladzte na približne 20 °C a pridajte 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.7). Doplňte objem vodou na 100 ml a zhomogenizujte. Odoberte najviac 25 ml s obsahom menej ako 60 mg redukujúcich cukrov vyjadrených ako glukóza. V prípade potreby objem doplňte destilovanou vodou na 25 ml a stanovte obsah redukujúcich cukrov Luff-Schoorlovou metódou. Výsledok sa vyjadruje ako percento glukózy alebo, v prípade potreby, sacharózy vynásobením faktorom 0,95.

5.4. *Titrácia Luff-Schoorlovou metódou*

Do 300 ml Erlenmeyerovej banky napipetujte 25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.8); pridajte presne 25 ml vyčíreného roztoku cukru. Pridajte 2 granule pemzy (3.13) a zahrievajte za ručného miešania nad stredne vysokým voľným plameňom tak, aby ste kvapalinu priviedli do varu za približne dve minúty. Erlenmeyerovu banku položte okamžite na azbestom potiahnutú drôtenú sieťku s otvorom o priemere približne 6 cm, pod ktorou je zapálený plameň. Plameň sa musí regulovať tak, aby zahrieval len dno Erlenmeyerovej banky. K Erlenmeyerovej banke pripievajte spätný chladič. Varte presne desať minút. Okamžite ochladzte v studenej vode a po približne piatich minútach titrujte takto:

Pridajte 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a hneď pridajte 25 ml kyseliny sírovej (3.11) (opatrne, kvôli riziku silného penenia). Titrujte roztokom tiosíranu sodného (3.9) až do vzniku matnej žltej farby, pridajte škrobový indikátor (3.10) a dotitrujte.

Rovnakú titráciu vykonajte v presne odmeranej zmesi 25 ml Luff-Schoorlového činidla (3.8) a 25 ml vody, po pridaní 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a 25 ml kyseliny sírovej (3.11) bez varu.

6. **Výpočet výsledkov**

Podľa tabuľky stanovte množstvo glukózy v mg, zodpovedajúce rozdielu medzi hodnotami dvoch titrácií, vyjadrené v mg tiosíranu sodného 0,1 mol/liter. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. **Špeciálne postupy**

- 7.1. Ak ide o krmivá bohaté na melasu a krmivá, ktoré nie sú celkom homogénne, tak do 1 l odmernej banky navážte 20 g vzorky a pridajte 500 ml vody. Miešajte jednu hodinu na trepačke. Vyčirte pomocou Carrezovho činidla I (3.2) a Carrezovho činidla II (3.3) podľa bodu 5.1, tento raz však použite štvornásobné množstvá z každého činidla. Doplňte po značku 80 % etanolom (v/v).

Zhomogenizujte a prefiltrujte. Odstráňte etanol podľa bodu 5.1. Ak nie je prítomný žiadny dextrínovaný škrob, doplňte objem destilovanou vodou.

- 7.2. Ak ide o melasu a krmne suroviny bohaté na cukry a neobsahujúce takmer žiadny škrob (svätajánsky chlieb, sušené repné rezky atď.), navážte 5 g vzorky, vložte do 250 ml odmernej banky, pridajte 200 ml destilovanej vody a pretrepávajte na trepačke jednu hodinu alebo v prípade potreby dlhšie. Vyčirte pomocou Carrezových činidiel I (3.2) a II (3.3) postupom opísaným v bode 5.1. Doplňte objem studenou vodou, zhomogenizujte a prefiltrujte. Obsah celkových cukrov sa stanoví podľa bodu 5.3.

8. **Poznámky**

- 8.1. Aby sa zabránilo peneniu, odporúča sa pred varením s Luff-Schoorlovým činidlom pridať (bez ohľadu na objem) približne 1 ml 3-metylbutan-1-olu (3.14).

▼B

- 8.2. Po vynásobení rozdielu medzi obsahom celkových cukrov po inverzii, vyjadrených ako glukóza, a obsahom redukujúcich cukrov, vyjadrených ako glukóza, číslom 0,95, dostaneme percentuálny obsah sacharózy.
- 8.3. Na stanovenie obsahu redukujúcich cukrov okrem laktózy sa môžu použiť dve metódy:
- 8.3.1. Na približný výpočet vynásobte obsah laktózy stanovený inou analytickou metódou číslom 0,675 a odrátajte získaný výsledok z obsahu redukujúcich cukrov.
- 8.3.2. Na presný výpočet redukujúcich cukrov okrem laktózy sa pre dve konečné stanovenia použije tá istá vzorka. Jedna analýza sa vykonáva na časti roztoku získaného podľa bodu 5.1, druhá na časti roztoku získaného počas procesu stanovenia laktózy metódou stanovenou na tento účel (po fermentácii ostatných typov cukru a vyčistení).

V oboch prípadoch sa množstvo prítomného cukru stanovuje Luff-Schoorlovou metódou a vypočítava sa v mg glukózy. Jedna hodnota sa odráta od druhej a rozdiel sa vyjadrí ako percento vzorky.

Příklad

Obidva odobraté objemy zodpovedajú, pre každé stanovenie, vzorke s hmotnosťou 250 mg.

V prvom prípade spotreba 17 ml roztoku tiosíranu sodného 0,1 mol/liter zodpovedá 44,2 mg glukózy; v druhom prípade spotreba 11 ml zodpovedá 27,6 mg glukózy.

Rozdiel je 16,6 mg glukózy.

Obsah redukujúcich cukrov (okrem laktózy) vypočítaných ako glukóza, je preto:

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

Tabuľka hodnôt pre 25 ml Luff-Schoorlovho činidla

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/liter, pri dvojminútovom zahrievaní a 10 min. varu

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ liter	Glukóza, fruktóza, invertné cukry C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktóza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltóza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ liter
ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	mg	rozdiel	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. STANOVENIE LAKTÓZY****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah laktózy v krmivách obsahujúcich viac ako 0,5 % laktózy.

2. Podstata metódy

Cukry sa rozpustia vo vode. Roztok sa podrobí fermentácii kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré ponechávajú laktózu nedotknutú. Po vyčistení a prefiltrovaní sa obsah laktózy vo filtráte stanoví Luff-Schoorloovou metódou.

3. Chemikálie

3.1. Suspenzia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*: rozmiešajte 25 g čerstvých kvasníc v 100 ml vody. Táto suspenzia vydrží v chladničke najviac jeden týždeň.

3.2. Carrezovo činidlo I: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplnite vodou na 100 ml.

3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feroxyanidu draselného $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Doplnite vodou na 100 ml.

3.4. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného miešania nalejte roztok kyseliny citrónovej (3.4.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.4.3). Pridajte roztok síranu meďnatého (3.4.1) a doplnite vodou na objem 1 liter. Nechajte cez noc odstáť a prefiltrujte. Skontrolujte koncentráciu takto získaného činidla (Cu 0,05 mol/liter; Na_2CO_3 1 mol/liter). Hodnota pH roztoku má byť približne 9,4.

3.4.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustite 25 g pentahydrátu síranu meďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ neobsahujúceho železo v 100 ml vody.

3.4.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustite 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v 50 ml vody.

3.4.3. Roztok uhličitanu sodného: rozpustite 143,8 g bezvodného uhličitanu sodného v približne 300 ml teplej vody. Nechajte vychladnúť.

3.5. Granulovaná pemza prevarená v kyseline chlorovodíkovej, premytá vodou a vysušená.

3.6. 30 % roztok (w/v) jodidu draselného.

3.7. Kyselina sírová, 3 mol/liter.

3.8. Roztok tiosíranu sodného 0,1 mol/liter.

3.9. Roztok škrobu: pridajte zmes 5 g škrobu rozpusteného v 30 ml vody do 1 litra vriacej vody. Varte tri minúty, nechajte vychladnúť a v prípade potreby pridajte 10 mg jodidu ortuťnatého na konzervovanie.

4. Prístrojové vybavenie

Vodný kúpeľ s termostatom nastaveným na 38 – 40 °C.

5. Postup

Do 100 ml odmernej banky navážte 1 g vzorky s presnosťou na 1 mg. Pridajte 25 až 30 ml vody. Vložte banku do vriaceho vodného kúpeľa na tridsať minút a potom ochlaďte na teplotu približne 35 °C. Pridajte 5 ml suspenzie kvasiniek a zhomogenizujte. Nechajte banku dve hodiny odstáť vo vodnom kúpeli pri teplote 38 – 40 °C. Ochlaďte na teplotu približne 20 °C.

Pridajte 2,5 ml Carrezovho činidla I (3.2) a miešajte tridsať sekúnd, potom pridajte 2,5 ml Carrezovho činidla II (3.3) a opäť miešajte tridsať sekúnd. Doplnite objem vodou na 100 ml, potrepote a prefiltrujte.

▼B

Množstvo filtrátu, nie väčšie ako 25 ml, ktoré obsahuje 40 až 80 mg laktózy, napipetujte do 300 ml Erlenmeyerovej banky. V prípade potreby doplňte na objem 25 ml vodou.

Rovnakým postupom vykonajte slepý pokus s 5 ml suspenzie kvasiniek (3.1). Stanovte obsah laktózy podľa Luff-Schoorla takto: pridajte presne 25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.4) a dve granule pemzy (3.5). Miešajte ručne počas zahrievania nad stredne vysokým voľným plameňom a kvapalinu priveďte do varu za približne dve minúty. Erlenmeyerovu banku položte okamžite na azbestom potiahnutú drôtenú sieťku s otvorom o priemere približne 6 cm, pod ktorou je zapálený plameň. Plameň sa musí regulovať tak, aby zahrieval len dno Erlenmeyerovej banky. Na Erlenmeyerovú banku nasadte spätný chladič. Varte presne desať minút. Okamžite ochladte v studenej vode a po približne piatich minútach stitrujte takto:

Pridajte 10 ml roztoku jodidu draselného (3.6) a ihneď potom pridajte 25 ml kyseliny sírovej (3.7) (opatrne, kvôli riziku silného penenia). Titrujte roztokom tiosíranu sodného (3.8) až do vzniku matnej žltej farby, pridajte škrobový indikátor (3.9) a dotitrujte.

Rovnakú titráciu vykonajte v presne odmeranej zmesi 25 ml Luff-Schoorlového činidla (3.4) a 25 ml vody, po pridaní 10 ml roztoku jodidu draselného (3.6) a 25 ml kyseliny sírovej (3.7) bez varu.

6. Výpočet výsledkov

Pomocou priloženej tabuľky stanovte množstvo laktózy v mg, zodpovedajúce rozdielu medzi výsledkami dvoch titrácií, vyjadrené v ml tiosíranu sodného 0,1 mol/liter.

Vyjadrite výsledok ako podiel bezvodkej laktózy v percentách vzorky.

7. Poznámky

Pre produkty s obsahom viac ako 40 % fermentovateľného cukru použite viac ako 5 ml suspenzie kvasiniek (3.1).

Tabuľka hodnôt pre 25 ml Luff-Schoorlovho činidla

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/liter, pri dvojminútovom zahrievaní a 10 min. varu

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ liter	Glukóza, fruktóza, invertné cukry C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktóza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltóza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/ liter
ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	mg	rozdiel	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. STANOVENIE ŠKROBU****– POLARIMETRICKÁ METÓDA –****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu škrobu a produktov degradácie škrobu s vysokou molekulovou hmotnosťou v krmivách na účely kontroly súladu s deklarovanou energetickou hodnotou (v ustanoveniach prílohy VII) a smernicou Rady 96/25/ES ⁽¹⁾.

2. Podstata metódy

Táto metóda pozostáva z dvoch stanovení. Pri prvom stanovení sa vzorka upraví zriedenou kyselinou chlorovodíkovou. Po vyčistení a filtrácii sa polarimetrickým meraním stanoví optická otáčavosť roztoku.

Pri druhom stanovení sa vzorka extrahuje 40 % etanolom. Po okyslení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčistení a prefiltrovaní sa zmeria optická otáčavosť rovnakým spôsobom ako pri prvom stanovení.

Rozdiel medzi týmito dvomi meraniami, vynásobený známym faktorom udáva obsah škrobu vo vzorke.

3. Chemikálie

3.1. Roztok 25 % (w/v) kyseliny chlorovodíkovej, hustota: 1,126 g/ml.

3.2. Roztok 1,13 % (w/v) kyseliny chlorovodíkovej.

Koncentrácia sa musí skontrolovať titráciou s použitím roztoku hydroxidu sodného 0,1 mol/liter v prítomnosti 0,1 % (w/v) metylčervene v 94 % (v/v) etanole. Na neutralizáciu 10 ml je potrebných 30,94 ml NaOH 0,1 mol/liter.

3.3. Carrezovo činidlo I: rozpustíte vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte objem vodou na 100 ml.

3.4. Carrezovo činidlo II: rozpustíte vo vode 10,6 g trihydrátu feročyanidu draselného, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Doplňte objem vodou na 100 ml.

3.5. Roztok 40 % (v/v) etanolu, hustota: 0,948 g/ml pri 20 °C.

4. Prístrojové vybavenie

4.1. 250 ml Erlenmeyerova banka so zábrusom a so spätným chladičom

4.2. Polarimeter alebo sacharimeter.

5. Postup**5.1. Priprava vzorky**

Vzorku meľte dovedy, kým nebude dostatočne jemná, aby celá prešla cez sito s okrúhlymi otvormi 0,5 mm.

5.2. Stanovenie celkovej optickej otáčavosti (*P* alebo *S*) (pozri poznámku 7.1)

Navážte 2,5 g pomletej vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do 100 ml odmernej banky. Pridajte 25 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2), premiešajte tak, aby ste docielili rovnomerné rozptýlenie skúšobnej vzorky, a pridajte ďalších 25 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2). Banku ponorte do vriaceho vodného kúpeľa, pričom ňou prvé tri minúty intenzívne

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 125, 23.5.1996, s. 35.

▼ B

a sústavne pretrepávajú, aby sa zabránilo tvorbe hrudiek. Množstvo vody vo vodnom kúpeli musí byť dostatočné na to, aby kúpeľ zostal na bode varu aj po ponorení banky do kúpeľa. Banka sa nesmie vybrať z kúpeľa počas pretrepávania. Presne po 15 minútach ju vyberte z kúpeľa, pridajte 30 ml studenej vody a ihneď ochlaďte na teplotu 20 °C.

Pridajte 5 ml Carrezovho činidla I (3.3) a pretrepávajú približne 30 sekúnd. Potom pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.4) a znovu pretrepávajú približne 30 sekúnd. Doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte a prefiltrujte. Ak filtrát nebude dokonale číry, (čo je zriedkavé), stanovenie zopakujte s použitím väčšieho množstva Carrezových činidiel I a II, napr. 10 ml.

Zmerajte optickú otáčavosť roztoku v 200 mm trubici pomocou polarimetra alebo sacharimetra.

5.3. Stanovenie optickej otáčavosti (P' a S') látok rozpustných v 40 % etanole

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg, vložte do 100 ml odmernej banky a pridajte približne 80 ml etanolu (3.5) (pozri poznámku 7.2). Nechajte banku 1 hodinu odstáť pri laboratórnej teplote; počas tejto doby šesťkrát intenzívne pretrepte tak, aby sa skúšobná vzorka dôkladne premiešala s etanolom. Doplňte na požadovaný objem etanolom (3.5), premiešajte a prefiltrujte.

Do 250 ml Erlenmeyerovej banky napipetujte 50 ml filtrátu (čo zodpovedá 2,5 g vzorky), pridajte 2,1 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) a intenzívne pretrepte. Na Erlenmeyerovu banku nasadíte spätný chladič a banku ponorte do vriaceho vodného kúpeľa. Presne po 15 minútach Erlenmeyerovu banku z kúpeľa vyberte, obsah preneste do 100 ml odmernej banky, prepláchnite malým množstvom studenej vody a ochlaďte na teplotu 20 °C.

Vyčírtajte použitím Carrezových činidiel I (3.3) a II (3.4), doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte, prefiltrujte a zmerajte optickú otáčavosť spôsobom uvedeným v druhom a treťom odseku bodu 5.2.

6. Výpočet výsledkov

Obsah škrobu (%) sa vypočíta takto:

6.1. Meranie polarimetrom

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

P = celková optická otáčavosť v uhlových stupňoch,

P' = optická otáčavosť v uhlových stupňoch látok rozpustných v 40 % (V/V) etanole,

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = špecifická optická otáčavosť čistého škrobu. Číselné hodnoty bežne akceptované pre tento faktor sú:

+185,9°:	ryžový škrob,
+185,7°:	zemiakový škrob,
+184,6°:	kukuričný škrob,
+182,7°:	pšeničný škrob,
+181,5°:	jačmenný škrob,
+181,3°:	ovsený škrob,
+184,0°:	ostatné druhy škrobov a zmesi škrobov v krmných zmesiach.

6.2. Meranie sacharimetrom

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

▼B

- S = celková optická otáčavosť v sacharometrických stupňoch,
 S' = optická otáčavosť v sacharometrických stupňoch látok rozpustných v 40 % (v/v) etanole,
 N = hmotnosť (g) sacharózy v 100 ml vody poskytujúca optickú otáčavosť 100 sacharometrických stupňov pri meraní pomocou 200 mm trubice,
 16,29 g pre francúzske sacharimetre,
 26,00 g pre nemecké sacharimetre,
 20,00 g pre zmiešané sacharimetre,
 $[\alpha]_D^{20}$ = špecifická optická otáčavosť čistého škrobu (pozri bod 6.1).

6.3. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v rovnakej vzorke nesmie presiahnuť 0,4 v absolútnej hodnote pre obsah škrobu menší ako 40 % a 1 % relatívnych pre obsah škrobu rovný alebo väčší ako 40 %.

7. **Poznámky**

7.1. Ak vzorka obsahuje viac ako 6 % uhličitanov, vypočítaných ako uhličitan vápenatý, tieto sa musia rozložiť pred stanovením celkovej optickej otáčavosti presne známym množstvom zriedenej kyseliny sírovej.

7.2. Ak ide o produkty s vysokým obsahom laktózy, ako je sušené mliečne sérum alebo sušené odstredené mlieko, postupujte po pridaní 80 ml etanolu (3.5) takto: na Erlenmeyerovu banku nasadíte spätný chladič a banku ponorte na 30 minút do vodného kúpeľa s teplotou 50 °C. Nechajte vychladnúť a pokračujte v analýze podľa bodu 5.3.

7.3. Ak sú nasledovné krmné suroviny prítomné vo významnom množstve v krmivách, je známe, že spôsobujú interferencie pri stanovovaní obsahu škrobu polarimetrickou metódou, čo môže viesť k nesprávnym výsledkom:

— produkty z (cukrovej) repy, ako dužina z (cukrovej) repy, melasa z (cukrovej) repy, dužina z (cukrovej) repy – melasová, vinas z (cukrovej) repy, (repný) cukor,

— citrusová dužina,

— ľanové semeno; ľanové výlisky; ľanový extrahovaný šrot,

— repkové semeno; repkové výlisky; repkový extrahovaný šrot; šupky repkového semena,

— slnečnicové semeno; slnečnicový extrahovaný šrot; slnečnicový extrahovaný šrot z čiastočne lúpaných semien,

— výlisky z kopry; extrahovaný šrot z kopry,

— zemiaková dužina,

— dehydrované kvasnice,

— produkty bohaté na inulín (napríklad rezky a múčka z topinamburu),

— oškvarky.

M. STANOVENIE POPOLA

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah popola v krmivách.

▼B**2. Podstata metódy**

Vzorka sa spopolní pri teplote 550 °C, zvyšok sa odváži.

3. Chemikálie

20 % roztok (w/v) dusičnanu amónneho.

4. Prístrojové vybavenie**4.1. Vyhrievacia platňa****4.2. Elektrická muflová pec s termostatom.****4.3. Spaľovacie téglíky vyrobené z kremeňa, porcelánu alebo platiny buď obdĺžnikové (približne 60 × 40 × 25 mm), alebo valcovité (s priemerom: 60 až 75 mm, s výškou: 20 až 40 mm).****5. Postup**

Navážte s presnosťou na 1 mg približne 5 g vzorky (2,5 g v prípade, že ide o produkty, ktoré majú tendenciu napučiavať) a vložte do spaľovacieho téglíka, ktorý ste vopred vyžihali na 550 °C, nechali ochladiť a odvážili. Položte téglík na vyhrievaciu platňu a postupne zohrievajte až do zuhoľnatenia vzorky. Spopolňujte podľa bodu 5.1 alebo 5.2.

5.1. Téglík vložte do kalibrovannej muflovej pece nastavenej na teplotu 550 °C. Túto teplotu udržiavajte až do získania bieleho, bledosivého alebo červenkastého popola, bez obsahu uhlíkatých častíc. Vložte téglík do exsikátora, nechajte vychladnúť a okamžite odvážte.**5.2. Téglík vložte do kalibrovannej muflovej pece vyhriatej na 550 °C. Spopolňujte 3 hodiny. Vložte téglík do exsikátora, nechajte vychladnúť a okamžite odvážte. Opäť spopolňujte 30 minút, čím sa zabezpečí, že hmotnosť popola zostane konštantná (strata hmotnosti medzi dvoma po sebe nasledujúcimi váženiami musí byť najviac 1 mg).****6. Výpočet výsledkov**

Hmotnosť zvyšku vypočítajte odpočítaním hmotnosti téglíka.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky**7.1. *Látky, ktoré sa ťažko spopolňujú,* sa najskôr musia spopolňovať najmenej tri hodiny, ochladiť a potom sa k popolu pridá niekoľko kvapiek 20 % roztoku dusičnanu amónneho (opatrne, aby sa zabránilo rozptýleniu popola alebo tvorbe hrudiek). Po vysušení v sušiarňi pokračujte v žíhaní. Postup podľa potreby opakujte dovtedy, kým nebude spopolnenie ukončené.****7.2. *Ak ide o látky odolné voči úprave* opísanej v bode 7.1, postupujte takto: po trojhodinovom spopolňovaní vložte popol do teplej vody a prefiltrujte cez malý bezpopolový filter. Filter a jeho obsah spopolnite v pôvodnom téglíku. Filtrát vložte do vychladnutého téglíka, odparte do sucha, spopolnite a odvážte.****7.3. *V prípade olejov a tukov* presne navážte 25 g vzorky do téglíka vhodnej veľkosti. Zuhoľňujte pod lampou nastavenou na vzorku a pomocou pásika bezpopolového filtračného papiera. Po spálení zvlhčite čo možno najmenším množstvom vody. Vysušte a spopolnite postupom uvedenom v bode 5.**

▼B**N. STANOVENIE OBSAHU POPOLA, KTORÝ JE NEROZPUSTNÝ V KYSELINE CHLOROVODÍKOVEJ****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť v krmivách obsah minerálnych látok, ktoré sú nerozpustné v kyseline chlorovodíkovej. V závislosti od druhu vzorky sa môžu použiť dve metódy.

1.1. *Metóda A:* uplatniteľná na krmne suroviny organického pôvodu a na väčšinu krmných zmesí.

1.2. *Metóda B:* uplatniteľná na minerálne zlúčeniny a zmesi a na krmne zmesi, v ktorých je obsah látok nerozpustných v kyseline chlorovodíkovej, stanovený metódou A, väčší ako 1 %.

2. Podstata metódy

2.1. *Metóda A:* vzorka sa spopolní, popol sa uvarí v kyseline chlorovodíkovej a nerozpustný zvyšok sa prefiltruje a odváži.

2.2. *Metóda B:* na vzorku sa pôsobí kyselinou chlorovodíkovou. Roztok sa prefiltruje, zvyšok sa spopolní a takto získaný popol sa spracuje podľa metódy A.

3. Chemikálie

3.1. Kyselina chlorovodíková 3 mol/liter.

3.2. 20 % roztok (w/v) kyseliny trichlóroctovej.

3.3. 1 % roztok (w/v) kyseliny trichlóroctovej.

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Vyhrievacia platňa.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatom.

4.3. Spaľovacie téglíky vyrobené z kremeňa, porcelánu alebo platiny buď obdĺžnikové (približne 60 × 40 × 25 mm), alebo valcovité (s priemerom: 60 až 75 mm, s výškou: 20 až 40 mm).

5. Postup**5.1. Metóda A**

Vzorku spopolnite postupom opísaným pri stanovení popola. Môže sa použiť aj popol získaný takou analýzou.

Popol vložte do 250 až 400 ml kadičky pomocou 75 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Pomaly priveďte do varu a nechajte mierne vriť 15 minút. Teplý roztok prefiltrujte cez bezpopolový filtračný papier a zvyšok premývajte teplou vodou, až do odstránenia kyslej reakcie. Filter so zvyškom vysušte a spopolnite v odváženom téglíku pri teplote najmenej 550 °C a najviac 700 °C. Nechajte vychladnúť v exsíkátore a odvážte.

5.2. Metóda B

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do 250 až 400 ml kadičky. Pridajte 25 ml vody a následne 25 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), premiešajte a počkajte, kým neprestane šumieť. Pridajte ďalších 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Počkajte, kým sa prestane uvoľňovať akýkoľvek plyn, potom kadičku vložte do vriaceho vodného kúpeľa na

▼B

tridsať minút, prípadne na dlhšie, aby sa dôkladne zhydrolyzoval všetok prítomný škrob. Prefiltrujte ešte za tepla cez bezpopulový filter a filter premyte 50 ml teplej vody (pozri poznámku 7). Filter so zvyškom vložte do spaľovacieho téglika, vysušte a spopolnite pri teplote najmenej 550 °C a najviac 700 °C. Popol vložte do 250 až 400 ml kadičky pomocou 75 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1); pokračujte postupom opísaným v druhom pododseku bodu 5.1.

6. **Výpočet výsledkov**

Hmotnosť zvyšku vypočítajte odpočítaním hmotnosti téglika. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. **Poznámky**

Ak je filtrácia obtiažna, začnite analýzu znova, pričom 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) nahradíte 50 ml 20 % kyseliny trichlóroctovej (3.2) a filter premyte teplým roztokom 1 % kyseliny trichlóroctovej (3.3).

O. STANOVENIE UHLIČITANOV

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo uhličitanov, všeobecne vyjadrené ako uhličitan vápenatý vo väčšine krmív.

V určitých prípadoch sa musí použiť špeciálna metóda (napr. ak ide o uhličitan železa).

2. **Podstata metódy**

Uhličitan sa rozloží v kyseline chlorovodíkovej; uvoľnený oxid uhličitý sa zachytí do odmernej skúmavky a jeho objem sa porovná s objemom uvoľneným za tých istých podmienok zo známeho množstva uhličitanu vápenatého.

3. **Chemikálie**

3.1. Kyselina chlorovodíková, hustota $c = 1,10$ g/ml.

3.2. Uhličitan vápenatý.

3.3. Kyselina sírová, približne 0,05 mol/liter, zafarbená metylčerveňou.

4. **Prístrojové vybavenie**

Scheibler-Dietrichov prístroj (pozri obrázok) alebo ekvivalentný prístroj.

5. **Postup**

Podľa obsahu uhličitanu vo vzorke navážte časť vzorky takto:

- 0,5 g, ak ide o produkty obsahujúce od 50 do 100 % uhličitanov vyjadrených ako uhličitan vápenatý,
- 1 g, ak ide o produkty obsahujúce od 40 do 50 % uhličitanov vyjadrených ako uhličitan vápenatý,
- 2 až 3 g, ak ide o ostatné produkty.

Vložte naváženu vzorku do špeciálnej banky (4) prístroja, opatrenej malou trubičkou z nerozbitného materiálu obsahujúcou 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), a banku pripojte k prístroju. Otočte trojcestný kohút (5) tak, aby trubička (1) bola spojená s vonkajškom. Mobilnou trubičkou (2), naplnenou zafarbenou kyselinou sírovou (3.3) a spojenou s odmernou skúmavkou (1), nastavte hladinu kvapaliny na značku nula. Otočte kohútom (5) tak, aby sa trubičky (1) a (3) prepojili, a skontrolujte, či je hladina na nule.

Nechajte kyselinu chlorovodíkovú (3.1) pomaly vytiecť do vzorky, pričom banku nakloňte (4). Vyrovnajte tlaky znížením trubičky (2). Bankou (4) pretrepávajte až do úplného ukončenia uvoľňovania oxidu uhličitého.

Tlak obnovte tak, že kvapalinu v trubičkách (1) a (2) vyrovnáte do rovnakej hladiny. Po *niekoľkých minútach*, po ustálení objemu plynu zaznamenajte odčítanú hodnotu.

Vykonajte kontrolnú skúšku za tých istých podmienok s 0,5 g uhličitanu vápenatého (3.2).

▼ B**6. Výpočet výsledkov**

Obsah uhličitanov, vyjadrený ako uhličitan vápenatý, sa vypočíta podľa vzorca:

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

kde:

X = % (w/w) uhličitanov vo vzorke, vyjadrené ako uhličitan vápenatý,

V = ml CO_2 uvoľneného z navážky vzorky,

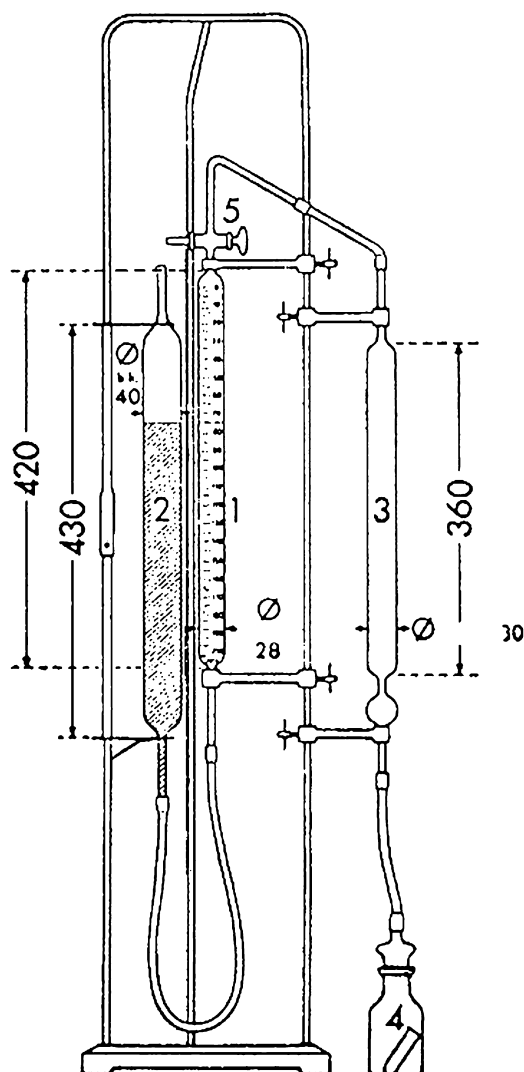
V_1 = ml CO_2 uvoľneného z 0,5 g CaCO_3 ,

m = hmotnosť navážky vzorky v gramoch.

7. Poznámky

7.1. Ak je hmotnosť navážky vzorky viac ako 2 g, do banky (4) najskôr pridajte 15 ml destilovanej vody (4) a pred začatím skúšky premiešajte. Pri kontrolnej skúške použite rovnaký objem vody.

7.2. Ak má použitý prístroj iný objem ako Scheibler-Dietrichov prístroj, musí sa hmotnosť navážky vzorky a kontrolnej látky, ako aj výpočet výsledkov, príslušne upraviť.

SCHEIBLER-DIETRICHOV PRÍSTROJ NA STANOVENIE CO_2 

(v mm)

▼B**P. STANOVENIE OBSAHU CELKOVÉHO FOSFORU****FOTOMETRICKÁ METÓDA****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah celkového fosforu v krmivách. Je vhodná najmä na analýzu produktov s nízkym obsahom fosforu. V určitých prípadoch (ak ide o produkt bohatý na fosfor) je možné použiť gravimetrickú metódu.

2. Podstata metódy

Vzorka sa mineralizuje buď suchým spaľovaním (v prípade organických krmív), alebo rozkladom kyselinou (v prípade minerálnych zlúčenín a tekutých krmív) a umiestni sa do roztoku kyseliny. Roztok sa upraví molybdatovanádovým činidlom. Optická hustota takto vzniknutého žltého roztoku sa meria spektrofotometrom pri 430 nm.

3. Chemikálie**3.1. Uhličitan vápenatý.**

3.2. Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} 1,10 g/ml (približne 6 mol/liter).

3.3. Kyselina dusičná, ρ_{20} 1,045 g/ml.

3.4. Kyselina dusičná, ρ_{20} 1,38 až 1,42 g/ml.

3.5. Kyselina sírová, ρ_{20} 1,84 g/ml.

3.6. Molybdatovanádové činidlo: zmiešajte 200 ml roztoku heptamolybdénanu amónneho (3.6.1), 200 ml roztoku vanadičnanu amónneho (3.6.2) a 134 ml kyseliny dusičnej (3.4) v 1 l odmernej banke. Doplňte destilovanou vodou na celkový objem.

3.6.1. Roztok heptamolybdénanu amónneho: rozpustite v horúcej vode 100 g heptamolybdénanu amónneho $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Pridajte 10 ml amoniaku (hustota 0,91 g/ml) a doplňte vodou na objem 1 liter.

3.6.2. Roztok vanadičnanu amónneho: rozpustite 2,35 g vanadičnanu amónneho NH_4VO_3 v 400 ml horúcej vody. Za stáleho miešania pomaly pridajte 20 ml zriedenej kyseliny dusičnej (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O a doplňte vodou na objem 1 liter.

3.7. Štandardný roztok 1 mg fosforu na 1 ml: vo vode rozpustite 4,387 g dihydrofosforečnanu draselného KH_2PO_4 . Doplňte vodou na objem 1 liter.

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Kremenné, porcelánové alebo platinové spaľovacie tégly.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatom nastavená na 550 °C.

4.3. 250 ml Kjeldahlova banka.

4.4. Odmerné banky a presné pipety.

4.5. Spektrofotometer.

4.6. Skúmavky o priemere približne 16 mm so zátkami o priemere 14,5 mm a s objemom 25 až 30 ml.

5. Postup**5.1. Priprava roztoku**

Pripravte roztok podľa druhu vzorky, ako je uvedené v bode 5.1.1 alebo 5.1.2.

5.1.1. Obvyklý postup

Navážte 1 g alebo väčšie množstvo vzorky s presnosťou na 1 mg. Skúšobnú vzorku vložte do Kjeldahlovej banky, pridajte 20 ml kyseliny sírovej (3.5), pretrepte, aby sa látka úplne nasýtila kyselinou a aby sa zamedzilo jej prílepeniu na steny banky, zahrejte a 10 minút udržiavajte na bode varu. Nechajte pomaly vychladnúť, pridajte 2 ml kyseliny dusičnej

▼B

(3.4), jemne zahrejte, nechajte pomaly vychladnúť, pridajte trochu viac kyseliny dusičnej (3.4) a prived'ite znovu do bodu varu. Tento postup opakujte, až kým nezískate bezfarebný roztok. Ochlad'ite, pridajte trochu vody, zlejte kvapalinu do 500 ml odmernej banky, Kjeldahlovu banku vypláchnite horúcou vodou. Nechajte vychladnúť, doplňte vodou do celkového objemu, zhomogenizujte a prefiltrujte.

5.1.2. **Vzorky obsahujúce organické látky a vzorky bez dihydrofosforečnanov vápenatých a horečnatých**

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg do spaľovacieho téglika. Miešajte skúšobnú vzorku, až kým sa úplne nespojí s 1 g uhličitanu vápenatého (3.1). Spopolňujte v peci pri teplote 550 °C, až kým nezískate biely alebo sivý popol (malé množstvo dreveného uhlia neprekáža). Preneste popol do 250 ml kadičky. Pridajte 20 ml vody a kyselinu chlorovodíkovú (3.2), až kým neprestane šumieť. Pridajte ďalších 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2). Uložte kadičku do pieskového kúpeľa a odparujte do sucha, čím sa kremeň prevedie na nerozpustnú formu. Rozpusťte zvyšok v 10 ml kyseliny dusičnej (3.3) a varte v pieskovom kúpeli alebo na vyhrievacej platni 5 minút bez odparovania do sucha. Zlejte kvapalinu do 500 ml odmernej banky, kadičku niekoľkokrát vypláchnite horúcou vodou. Nechajte vychladnúť, objem doplňte vodou, zhomogenizujte a prefiltrujte.

5.2. *Výfarbenie a meranie optickej hustoty*

Zried'te alikvotnú časť filtrátu získaného podľa bodu 5.1.1 alebo 5.1.2, aby ste získali koncentráciu fosforu, nie väčšiu ako 40 µg/ml. Do skúmavky (4.6) vlejte 10 ml tohto roztoku a pridajte 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6). Zhomogenizujte a nechajte odstáť najmenej 10 minút pri teplote 20 °C. Zmerajte optickú hustotu v spektrofotometri pri 430 nm oproti roztoku získanému pridaním 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6) do 10 ml vody.

5.3. *Kalibračná krivka*

Zo štandardného roztoku (3.7) pripravte roztoky obsahujúce 5, 10, 20, 30 a 40 µg fosforu na ml. Zoberte 10 ml z každého roztoku a pridajte do nich 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6). Zhomogenizujte a nechajte odstáť najmenej 10 minút pri teplote 20 °C. Zmerajte optickú hustotu, ako je uvedené v bode 5.2. Zostrojte kalibračnú krivku vynesením optických hustôt oproti zodpovedajúcim množstvám fosforu. Pri koncentráciách medzi 0 a 40 µg bude krivka lineárna.

6. **Výpočet výsledkov**

Použitím kalibračnej krivky stanovte množstvo fosforu v skúšobnej vzorke.

Výsledok vyjadrite ako percentá zo vzorky.

Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 3 % relatívnych z hodnoty vyššieho výsledku pri obsahu fosforu nižšom ako 5 %,

— 0,15 % v absolútnej hodnote pri obsahu fosforu 5 % alebo viac.

▼B**Q. STANOVENIE CHLÓRU Z CHLORIDOV****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo chlóru v chloridoch rozpustných vo vode, bežne vyjadrené ako chlorid sodný. Uplatňuje sa v prípade všetkých krmív.

2. Podstata metódy

Chloridy sa rozpustia vo vode. Ak produkt obsahuje organické látky, vyčíri sa. Roztok sa mierne okyslí kyselinou dusičnou a chloridy sa vyzrážajú vo forme chloridu strieborného roztokom dusičnanu strieborného. Prebytok dusičnanu strieborného sa stitruje roztokom tiokyanatanu amónneho Volhardovou metódou.

3. Chemikálie

- 3.1. Roztok tiokyanatanu amónneho 0,1 mol/liter.
- 3.2. Roztok dusičnanu strieborného 0,1 mol/liter.
- 3.3. Nasýtený roztok síranu železito-amónneho $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Kyselina dusičná, hustota: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietyléter.
- 3.6. Acetón.
- 3.7. Carrezovo činidlo I: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.8. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu ferokyanidu draselného, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.9. Aktívne uhlie, ktoré neobsahuje chloridy a ani ich neabsorbuje.

4. Prístrojové vybavenie

Mixér (trepačka): približne 35 až 40 ot/min.

5. Postup**5.1. Príprava roztoku**

Prípravte roztok podľa druhu vzorky, ako je uvedené v bodoch 5.1.1, 5.1.2 alebo 5.1.3.

Zároveň vykonajte *slepý pokus* bez použitia vzorky, ktorá sa má analyzovať.

5.1.1. Vzorky bez organických látok

Navážte s presnosťou na 1 mg vzorku v množstve najviac 10 g, aby obsahovala najviac 3 g chlóru vo forme chloridov. Vložte spolu so 400 ml vody do 500 ml odmernej banky pri teplote približne 20 °C. Miešajte po dobu tridsať minút v trepačke, doplňte na požadovaný objem, zhomogenizujte a prefiltrujte.

5.1.2. Vzorky s obsahom organických látok, okrem produktov uvedených v bode 5.1.3

Navážte približne 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte spolu s 1 g aktívneho uhlia do 500 ml odmernej banky. Pridajte 400 ml vody pri teplote približne 20 °C a 5 ml Carrezovho činidla I (3.7), miešajte 30 sekúnd a pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.8). Miešajte po dobu tridsať minút v trepačke, doplňte na požadovaný objem, zhomogenizujte a prefiltrujte.

▼B

- 5.1.3. Tepelne upravené krmivá, ľanové výlisky a múčka, produkty bohaté na ľanovú múčku a ostatné produkty bohaté na slizovité alebo na koloidné látky (napr. dextrínovaný škrob)

Pripravte roztok postupom opísaným v bode 5.1.2, ale bez filtrácie. Nechajte usadiť (podľa potreby odstredíte), odoberte 100 ml supernatantu a preneste do 200 ml odmernej banky. Zmiešajte s acetónom (3.6) a doplňte na požadovaný objem týmto rozpúšťadlom, zhomogenizujte a prefiltrujte.

- 5.2. *Titrácia*

Do Erlenmeyerovej banky napipetujte 25 ml až 100 ml filtrátu (podľa predpokladaného obsahu chlóru) získaného podľa bodov 5.1.1, 5.1.2 alebo 5.1.3. Primeraná časť nesmie obsahovať viac ako 150 mg chlóru (Cl). Podľa potreby zriedte vodou na objem najmenej 50 ml, pridajte 5 ml kyseliny dusičnej (3.4), 20 ml nasýteného roztoku síranu železitoamónneho (3.3) a z byrety naplnenej po nulovú značku 2 kvapky roztoku tiokyanatanu amónneho (3.1). Byretou pridajte roztok dusičnanu strieborného (3.2), tak aby bol v prebytku 5 ml. Pridajte 5 ml dietyléteru (3.5) a intenzívne pretrepte, aby sa vytvorila zrazenina. Prebytok dusičnanu strieborného stitrujte roztokom tiokyanatanu amónneho (3.1) až do vzniku jednu minútu trvajúceho červenkasto-hnedého sfarbenia.

6. **Výpočet výsledkov**

Množstvo chlóru (X) vyjadrené ako % chloridu sodného sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

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

kde:

V_1 = ml pridaného roztoku dusičnanu strieborného 0,1 mol/l,

V_2 = ml roztoku tiokyanatanu amónneho 0,1 mol/l použitého na titráciu,

m = hmotnosť vzorky.

Ak slepý pokus naznačil, že roztok dusičnanu strieborného 0,1 mol/l sa spotreboval, odpočítajte túto hodnotu od objemu ($V_1 - V_2$).

7. **Poznámky**

- 7.1. Titráciu možno vykonať aj potenciometricky.
- 7.2. Produkty veľmi bohaté na oleje a tuky najskôr odtučnite dietyléterom alebo petroléterom.
- 7.3. V prípade rybej múčky možno titráciu vykonať Mohrovou metódou.



PRÍLOHA IV

METÓDY ANALÝZY NA KONTROLU OBSAHU POVOLENÝCH
DOPLNKOVÝCH LÁTKOK V KRMIVÁCH

A. STANOVENIE VITAMÍNU A

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah vitamínu A (retinolu) v krmivách a premixoch. Vitamín A zahŕňa *all-trans*-retinyl alkohol a jeho *cis*-izoméry, ktoré sa stanovujú touto metódou. Obsah vitamínu A sa vyjadří v medzinárodných jednotkách (m.j.) na kg. Jedna m.j. zodpovedá aktívite 0,300 µg *all-trans*-vitamín A alkoholu alebo 0,344 µg *all-trans*-vitamín A acetátu alebo 0,550 µg *all-trans*-vitamín A palmitátu.

Limit kvantifikácie je 2 000 m. j. vitamín A/kg.

2. Podstata metódy

Vzorka sa hydrolyzuje etanolovým roztokom hydroxidu draselného a vitamín A sa extrahuje do petroléru. Rozpúšťadlo sa odstráni odparením a zvyšok sa rozpustí v metanole a v prípade potreby sa zriedi na požadovanú koncentráciu. Obsah vitamínu A sa stanoví na reverznej fáze vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (RP-HPLC) použitím UV detektora alebo fluorescenčného detektora. Chromatografické parametre sa vyberajú tak, aby nedošlo k oddeleniu *all-trans*-vitamín A alkoholu a jeho *cis*-izomérov.

3. Chemikálie

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

3.2. Petroléter, rozpätie bodu varu $40\text{ }^{\circ}\text{C} - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.3. Metanol

3.4. Roztok hydroxidu draselného $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$

3.5. Roztok askorbátu sodného $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (pozri poznámku 7.7)

3.6. Sulfid sodný, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)

3.6.1. Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5\text{ mol/l}$ v glycerole, $\beta = 120\text{ g/l}$ (pre $x = 9$) (pozri poznámku 7.8)

3.7. Roztok fenolfaleínu, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ v etanole (3.1)

3.8. 2-Propanol

3.9. Mobilná fáza pre HPLC: zmes metanolu (3.3) a vody, napr. 980 + 20 (v + v). Presný pomer sa stanoví podľa charakteristiky použitej kolóny

3.10. Dusík bez obsahu kyslíka

3.11. *All-trans*-vitamín A acetát, extra čistý, so zaručenou aktivitou, napr. $2,80 \times 10^6\text{ m.j./g}$

3.11.1. Zásobný roztok *all-trans*-vitamín A acetátu: do 100 ml odmernej banky navážte 50 mg acetátu vitamínu A s presnosťou na 0,1 mg (3.11). Rozpusťte v 2-propanole (3.8) a doplňte po značku tým istým rozpúšťadlom. Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 1 400 m.j. vitamínu A na ml. Presný obsah sa musí stanoviť podľa bodu 5.6.3.1.

3.12. *All-trans*-vitamín A palmitát, extra čistý, so zaručenou aktivitou, napr. $1,80 \times 10^6\text{ m.j./g}$

▼B

3.12.1. Zásobný roztok all-*trans*-vitamín A palmitátu: do 100 ml odmernej banky navážte 80 mg acetátu vitamínu A s presnosťou na 0,1 mg (3.12). Rozpusťte v 2-propanole (3.8) a doplňte po značku tým istým rozpúšťadlom. Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 1 400 m.j. vitamínu A na ml. Presný obsah sa musí stanoviť podľa bodu 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (pozri poznámku 7.5)

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Rotačná vákuová odparka

4.2. Hnedé sklo

4.2.1. Kužeľová banka alebo banka s rovným dnom, 500 ml, so zábrusovým hrdlom

4.2.2. Odmerné banky so zábrusovými zátkami, s úzkym hrdlom, 10, 25, 100 a 500 ml

4.2.3. Oddeľovacie lieviky, kónické, 1 000 ml, so zábrusovými zátkami

4.2.4. Hruškovité banky, 250 ml, so zábrusovými hrdlami

4.3. Allihnov chladič, dĺžka plášťa 300 mm, so zábrusovým spojom, s prípojkou na prívod plynu

4.4. Skladaný filtračný papier na fázovú separáciu, priemer 185 mm (napr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Prístroj HPLC so vstrekovacím systémom

4.5.1. Kolóna na kvapalnú chromatografiu, 250 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 5 alebo 10 µm alebo ekvivalentná (kritérium účinnosti: za uvedených podmienok HPLC len jeden pík pre všetky all-retinolové izoméry)

4.5.2. UV alebo fluorescenčný detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou

4.6. Spektrofotometer s 10 mm kremennými kyvetami

4.7. Vodný kúpeľ s magnetickým miešaním

4.8. Extrakčná aparatura (pozri obrázok 1) pozostávajúca zo:

4.8.1. skleneného valca s objemom 1 l, so zábrusovým hrdlom a zátkou;

4.8.2. sklenenej vložky so zábrusom, s bočným ramenom a s nastaviteľnou trubicou vedenou stredom. Nastaviteľná rúrka musí mať spodný koniec v tvare písmena U a na opačnom konci stričku tak, aby vrchná tekutá vrstva vo valci mohla byť prenesená do oddeľovacieho lievika.

5. Postup

Poznámka: Vitamín A je citlivý na (UV) svetlo a na oxidáciu. Všetky činnosti sa musia vykonávať bez svetla (používať tmavé sklo alebo sklo obalené hliníkovou fóliou) a kyslíka (vytláčať sa dusíkom). Počas extrakcie sa vzduch nad kvapalinou nahradí dusíkom (zabráňte nadbytočnému tlaku občasným uvoľnením zátky).

5.1. Priprava vzorky

Zomeľte vzorku tak, aby prešla sitom o veľkosti ôk 1 mm, pričom zabráňte, aby sa pri mletí zohriala. Mletie sa musí vykonať **tesne** pred navážením a zmydlením, inak môže dôjsť k stratám vitamínu A.

▼B**5.2. Zmydelnenie**

V závislosti od obsahu vitamínu A navážte 2 g až 25 g vzorky s presnosťou na 1 mg do 500 ml banky s rovným dnom alebo do kužeľovej banky (4.2.1). Do banky sa postupne pridá za krúženia 130 ml etanolu (3.1), približne 100 mg BHT (3.13), 2 ml roztoku askorbátu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Pripevnite chladič (4.3) k banke a ponorte banku do vodného kúpeľa s magnetickým miešaním (4.7). Zahrejte až do varu a nechajte 5 minút refluxovať. Potom pridajte cez chladič (4.3) 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) a nechajte refluxovať ďalších 25 minút za miešania pod slabým prúdom dusíka. Potom chladič vypláchnite približne 20 ml vody a ochladte obsah banky na laboratórnu teplotu.

5.3. Extrakcia

Po dekantácii a po premytí celkovým objemom 250 ml vody zmydelnený roztok kvantitatívne preneste do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3) alebo do extrakčnej aparatury (4.8). Vymyte zmydelňovaciu banku postupne 25 ml etanolu (3.1) a 100 ml petroleteru (3.2) a preneste tieto kvapaliny do oddeľovacieho lievika alebo do extrakčnej aparatury. Pomer vody a etanolu v zmiešanom roztoku musí byť okolo 2 : 1. Oddeľovacím lievikom intenzívne pretrepávajte 2 minúty a potom nechajte 2 minúty usadiť.

5.3.1. Extrakcia s použitím oddeľovacieho lievika (4.2.3)

Po oddelení vrstiev (pozri poznámku 7.3) preneste vrstvu petroleteru do ďalšieho oddeľovacieho lievika (4.2.3). Zopakujte túto extrakciu dvakrát so 100 ml petroleteru (3.2) a dvakrát s 50 ml petroleteru (3.2).

Spojené extrakty premyte dvakrát 100 ml vody v oddeľovacom lieviku miernym krúžením (aby sa zabránilo vytvoreniu emulzie) a potom opakovaným pretrepaním ďalšími 100 ml vody, až kým voda nezostane po pridaní roztoku fenolftaleínu (3.7) bezfarebná (premytie štyrikrát zvyčajne postačuje). Premytý extrakt prefiltrujte do 500 ml odmernej banky (4.2.2) cez suchý skladaný filter na fázovú separáciu (4.4), aby sa odstránila všetka suspendovaná voda. Oddeľovací lievik a filter opláchnite 50 ml petroleteru (3.2), banku doplňte po značku petroleterom (3.2) a dobre zamiešajte.

5.3.2. Extrakcia v extrakčnej aparature (4.8)

Po oddelení vrstiev (pozri poznámku 7.3) vymeňte zátku skleneného valca (4.8.1) za sklenenú vložku so zábrusom (4.8.2) a nastavte spodný koniec nastaviteľnej rúrky v tvare písmena U tak, aby bol tesne nad hladinou. Pomocou tlaku dusíka do bočného ramena preneste hornú vrstvu petroleteru do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3). Do skleneného valca pridajte 100 ml petroleteru (3.2), zazátkujte a dobre premiešajte. Nechajte oddeliť vrstvy a hornú vrstvu preneste opäť do oddeľovacieho lievika. Opakujte extrakciu ďalšími 100 ml petroleteru (3.2), potom dvakrát po 50 ml petroleteru (3.2) a vrstvy petroleteru pridajte do oddeľovacieho lievika.

Spojené extrakty petroleteru premyte postupom opísaným v bode 5.3.1. a ďalej postupujte podľa tohto bodu.

5.4. Priprava roztoku vzorky pre HPLC

Alikvotnú časť roztoku petroleteru (z 5.3.1. alebo 5.3.2) napipetujte do 250 ml hruškovitej banky (4.2.4). Odparte rozpúšťadlo takmer dosucha v rotačnej vákuovej odparke (4.1) za zníženého tlaku pri teplote kúpeľa

▼B

nepresahujúcej 40 °C. Obnovte atmosférický tlak vpustením dusíka (3.10) a vyberte banku z rotačnej odparky. Odstráňte zvyšné rozpúšťadlo prúdom dusíka (3.10) a zvyšok ihneď rozpustíte v známom objeme (10 – 100 ml) metanolu (3.3) (koncentrácia vitamínu A musí byť v rozsahu od 5 m.j./ml do 30 m.j./ml).

5.5. Stanovenie HPLC

Vitamín A sa oddelí na reverznej fáze kolóny C₁₈ (4.5.1) a koncentrácia sa zmeria UV detektorom (325 nm) alebo fluorescenčným detektorom (excitácia: 325 nm, emisia: 475 nm) (4.5.2).

Vstreknite alikvotnú časť (napr. 20 µl) roztoku metanolu získaného podľa bodu 5.4 a vymyte mobilnou fázou (3.9). Vypočítajte priemernú výšku (plochu) píku niekoľkých nástrekov roztoku tej istej vzorky a priemernú výšku (plochu) píku niekoľkých nástrekov kalibračných roztokov (5.6.2).

Podmienky HPLC

Odporúčané sú nasledujúce podmienky; iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov.

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.5.1):	250 mm × 4 mm, s náplňou C ₁₈ , 5 alebo 10 µm, alebo ekvivalentná
Mobilná fáza (3.9):	zmes metanolu (3.3) a vody napr. 980 + 20 (v + v).
Prietoková rýchlosť:	1 – 2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV detektor (325 nm) alebo fluorescenčný detektor (excitácia: 325 nm, emisia: 475 nm)

5.6. Kalibrácia

5.6.1. Príprava pracovných štandardných roztokov

Do 500 ml banky s rovným dnom alebo do kužeľovej banky (4.2.1) napipetujte 20 ml zásobného roztoku vitamínu A acetátu (3.11.1) alebo 20 ml zásobného roztoku vitamínu A palmitátu (3.12.1) a hydrolyzujte podľa bodu 5.2, ale nepridávajte BHT. Následne extrahujte petroléterom (3.2) podľa bodu 5.3 a doplňte petroléterom na 500 ml (3.2). Odparte 100 ml tohto roztoku na rotačnej odparke (pozri bod 5.4) takmer dosucha, odstráňte zvyšné rozpúšťadlo prúdom dusíka (3.10) a zvyšok opäť rozpustíte v 10,0 ml metanolu (3.3). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 560 m.j. vitamínu A na ml. Presný obsah sa musí stanoviť podľa bodu 5.6.3.3. Pracovný štandardný roztok sa musí pripravovať čerstvý tesne pred použitím.

2,0 ml tohto pracovného štandardného roztoku napipetujte do 20 ml odmernej banky, doplňte metanolom po značku (3.3) a premiešajte. Nominálna koncentrácia tohto **zriedeného** pracovného štandardného roztoku je 56 m.j. vitamínu A na ml.

5.6.2. Príprava kalibračných roztokov a kalibračný graf

Do 20 ml odmerných baniek postupne preneste 1,0, 2,0, 5,0 a 10,0 ml **zriedeného** pracovného štandardného roztoku, doplňte metanolom po značku (3.3) a zamiešajte. Nominálne koncentrácie týchto roztokov sú 2,8, 5,6, 14,0 a 28,0 m.j. vitamínu A na ml.

Niekoľkokrát vstreknite 20 µl každého kalibračného roztoku a stanovte priemernú výšku (plochu) píku. Z priemerných výšok (plôch) píkov zostrojte kalibračný graf s ohľadom na výsledky UV kontroly (5.6.3.3).

▼B**5.6.3. UV štandardizácia štandardných roztokov****5.6.3.1. Zásobný roztok vitamín A acetátu**

Do 50 ml odmernej banky (4.2.2) napipetujte 2,0 ml zásobného roztoku vitamín A acetátu (3.11.1) a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 56 m.j. vitamínu A na ml. Do 25 ml odmernej banky napipetujte 3,0 ml tohto zriedeného roztoku vitamín A acetátu a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 6,72 m.j. vitamínu A na ml. V spektrofotometri (4.6) zmerajte UV spektrum tohto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmedzí 300 nm a 400 nm. Extinkčné maximum musí byť medzi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$\text{m.j. vitamínu A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ pre vitamín A acetát = 1 530 pri 326 nm v 2-propanole)

5.6.3.2. Zásobný roztok vitamín A palmitátu

Do 50 ml odmernej banky (4.2.2) napipetujte 2,0 ml zásobného roztoku vitamín A palmitátu (3.12.1) a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 56 m.j. vitamínu A na ml. Do 25 ml odmernej banky napipetujte 3,0 ml tohto zriedeného roztoku vitamín A palmitátu a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 6,72 m.j. vitamínu A na ml. V spektrofotometri (4.6) zmerajte UV spektrum tohto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmedzí 300 nm a 400 nm. Extinkčné maximum musí byť medzi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$\text{m.j. vitamínu A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ pre vitamín A palmitát = 957 pri 326 nm v 2-propanole)

5.6.3.3. Pracovný štandardný roztok vitamínu A

Do 50 ml odmernej banky (4.2.2) napipetujte 3,0 ml **nezriedeného** pracovného štandardného roztoku vitamínu A pripraveného podľa bodu 5.6.1 a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Do 25 ml odmernej banky napipetujte 5,0 ml tohto roztoku a doplňte po značku 2-propanolom (3.8). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 6,72 m.j. vitamínu A na ml. V spektrofotometri (4.6) zmerajte UV spektrum tohto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmedzí 300 nm a 400 nm. Extinkčné maximum musí byť medzi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$\text{m.j. vitamínu A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ pre vitamín A alkohol = 1 821 pri 325 nm v 2-propanole)

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku vitamínu A v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v m.j./ml porovnaním s kalibračným grafom (5.6.2).

▼B

Obsah w vitamínu A v m.j./kg vzorky sa vypočíta podľa vzorca:

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

kde:

c = koncentrácia vitamínu A v roztoku vzorky (5.4) v m.j./ml,

V_1 = objem roztoku vzorky (5.4) v ml,

V_2 = objem alikvotnej časti z 5.4 v ml,

m = hmotnosť navážky vzorky v g.

7. Poznámky

- 7.1. V prípade vzoriek s nízkou koncentráciou vitamínu A je vhodné spojiť extrakty petroléteru z dvoch dávok po zmydelnení (navážované množstvo: 25 g) do jedného roztoku vzorky pre stanovenie HPLC.
- 7.2. Navážka vzorky odobratej na analýzu nesmie obsahovať viac ako 2 g tuku.
- 7.3. Ak nedôjde k oddeleniu fáz, pridajte približne 10 ml etanolu (3.1) aby sa narušila emulzia.
- 7.4. V prípade oleja z treščekej pečene a iných čistých tukov sa má čas zmydelnenia predĺžiť na 45 – 60 minút.
- 7.5. Namiesto BHT sa môže použiť hydrochinón
- 7.6. Použitím kolóny s normálnou fázou je možné oddeliť izoméry retinolu. Avšak v takomto prípade sa výšky (plochy) všetkých pík cis a trans izomérov musia pri výpočte počítať.
- 7.7. Namiesto roztoku askorbátu sodného sa môže použiť približne 150 mg kyseliny askorbovej.
- 7.8. Namiesto roztoku sulfidu sodného sa môže použiť približne 50 mg EDTA.
- 7.9. V prípade analýzy vitamínu A v náhradkách mlieka je potrebné venovať špecifickú pozornosť:

— pri zmydelňovaní (5.2): v dôsledku množstva tuku prítomného vo vzorke bude pravdepodobne potrebné zvýšiť množstvo roztoku hydroxidu draselného (3.4),

— pri extrakcii (5.3): v dôsledku prítomnosti emulzií bude pravdepodobne potrebné zmeniť pomer 2 : 1 medzi vodou a etanolom.

Pri kontrole, či uplatnená metóda analýzy vedie k spoľahlivým výsledkom na tejto špecifickej hmote (náhradka mlieka), sa má na ďalšej skúšobnej vzorke vykonať skúška návratnosti. Ak je miera návratnosti nižšia ako 80 %, analytický výsledok sa musí upraviť s ohľadom na návratnosť.

8. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 15 % relatívnych z vyššieho výsledku

▼B9. Výsledky medzilaboratórneho štúdia ⁽¹⁾

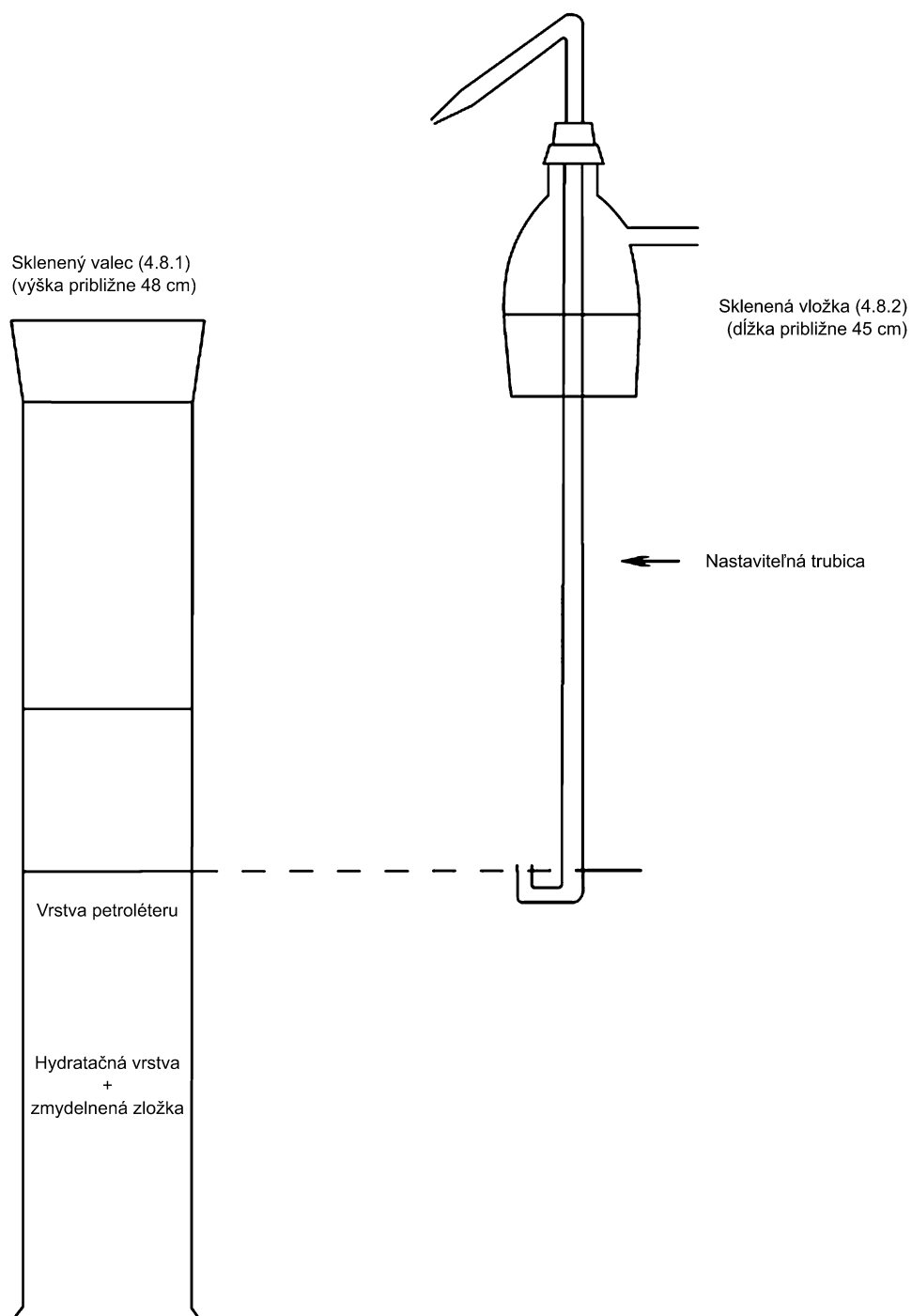
	Premix	Premixové krmivo	Minerálny koncentrát	Bielkovinové krmivo	Krmivo pre prasiatka
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
priemer [m.j./kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s _r [m.j./kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [m.j./kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s _R [m.j./kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [m.j./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 = počet laboratórií
 n = počet jednotlivých hodnôt
 s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti
 s_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti
 r = opakovateľnosť
 R = reprodukovateľnosť
 CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti
 CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti

⁽¹⁾ Vykonalá pracovná skupina v oblasti krmív Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Obrázok 1: Extrakčná aparatúra (4.8)



▼B**B. STANOVENIE VITAMÍNU E****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah vitamínu E v krmivách a premixoch. Obsah vitamínu E sa vyjadruje ako mg DL- α -tokoferol acetátu na kg. 1 mg DL- α -tokoferol acetátu zodpovedá 0,91 mg DL- α -tokoferolu (vitamín E).

Limit kvantifikácie je 2 mg vitamínu E/kg. Tento limit je možné dosiahnuť len fluorescenčným detektorom. Pri UV detektore je limit kvantifikácie 10 mg/kg.

2. Podstata metódy

Vzorka sa hydrolyzuje etanolovým roztokom hydroxidu draselného a vitamín E sa extrahuje do petroléteri. Rozpúšťadlo sa odstráni odparením a zvyšok sa rozpustí v metanole a v prípade potreby sa zriedi na požadovanú koncentráciu. Obsah vitamínu E sa stanoví na reverznej fáze vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (RP-HPLC) použitím fluorescenčného detektora alebo UV detektora.

3. Chemikálie

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Petroléter, rozpätie bodu varu $40\text{ }^{\circ}\text{C} - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.3. Metanol
- 3.4. Roztok hydroxidu draselného $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Roztok askorbátu sodného, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (pozri poznámku 7.7)
- 3.6. Sulfid sodný, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
 - 3.6.1. Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5\text{ mol/l}$ v glycerole, $\beta = 120\text{ g/l}$ (pre $x = 9$) (pozri poznámku 7.8)
- 3.7. Roztok fenolftaleínu, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ v etanole (3.1)
- 3.8. Mobilná fáza pre HPLC: zmes metanolu (3.3) a vody, napr. $980 + 20$ (v + v). Presný pomer sa stanoví podľa charakteristiky použitej kolóny.
- 3.9. Dusík bez obsahu kyslíka
- 3.10. DL- α -tokoferol acetát, extra čistý, so zaručenou aktivitou
 - 3.10.1. Zásobný roztok DL- α -tokoferol acetátu: do 100 ml odmernej banky navážte 100 mg DL- α -tokoferol acetátu (3.10) s presnosťou na 0,1 mg. Rozpustíte v etanole (3.1) a doplníte po značku tým istým rozpúšťadlom. 1 ml tohto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferol acetátu (pozri UV kontrolu v bode 5.6.1.3 a stabilizáciu v poznámke 7.4).
- 3.11. DL- α -tokoferol, extra čistý, so zaručenou aktivitou
 - 3.11.1. Zásobný roztok DL- α -tokoferolu: do 100 ml odmernej banky navážte 100 mg DL- α -tokoferolu (3.11) s presnosťou na 0,1 mg. Rozpustíte v etanole (3.1) a doplníte po značku tým istým rozpúšťadlom. 1 ml tohto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferolu (pozri UV kontrolu v bode 5.6.2.3 a stabilizáciu v poznámke 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) (pozri poznámku 7.5)

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Filmová rotačná odparka

▼B

- 4.2. Hnedé sklo
 - 4.2.1. Banky s rovným dnom alebo kužeľové banky, 500 ml, so zábrusovým hrdlom
 - 4.2.2. Odmerné banky so zábrusovými zátkami, s úzkym hrdlom, 10, 25, 100 a 500 ml
 - 4.2.3. Oddeľovacie lieviky, kónické, 1 000 ml, so zábrusovými zátkami
 - 4.2.4. Hruškovité banky, 250 ml, so zábrusovým hrdlom
- 4.3. Allihnov chladič, dĺžka plášťa 300 mm, so zábrusovým spojím, s prípojkou na prívod plynu
- 4.4. Skladaný filtračný papier na oddelenie fáz, priemer 185 mm (napr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. HPLC zariadenie so vstrekovacím systémom
 - 4.5.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 250 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 5 alebo 10 µm alebo ekvivalentná
 - 4.5.2. Fluorescenčný alebo UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou
- 4.6. Spektrofotometer s 10 mm kremennými kyvetami
- 4.7. Vodný kúpeľ s magnetickým miešaním
- 4.8. Extrakčná aparátúra (pozri obrázok 1) pozostávajúca zo:
 - 4.8.1. skleneného valca s objemom 1 l, so zábrusovým hrdlom a zátkou;
 - 4.8.2. sklenenej vložky so zábrusom, s bočným ramenom a s nastaviteľnou rúrkou vedenou stredom. Nastaviteľná rúrka musí mať spodný koniec v tvare písmena U a na opačnom konci stričku tak, aby vrchná tekutá vrstva vo valci mohla byť prenesená do oddeľovacieho lievika.

5. Postup

Poznámka: Vitamín E je citlivý na (UV) svetlo a na oxidáciu. Všetky činnosti sa majú vykonávať bez svetla (používať tmavé sklo alebo sklo obalené hliníkovou fóliou) a kyslíka (vytláčať sa dusíkom). Počas extrakcie sa vzduch nad kvapalinou nahradí dusíkom (zabráňte nadbytočnému tlaku občasným uvoľnením zátky).

5.1. Príprava vzorky

Zomel'te vzorku tak, aby prešla sitom o veľkosti ôk 1 mm, pričom zabráňte, aby sa pri mletí zohriala. Mletie sa musí vykonať **tesne** pred navážením a zmydlením, inak môže dôjsť k stratám vitamínu E.

5.2. Zmydlenie

V závislosti od obsahu vitamínu E navážte 2 g až 25 g vzorky s presnosťou na 0,01 g do 500 ml banky s rovným dnom alebo do kužeľovej banky (4.2.1). Do banky sa postupne pridá za krúženia 130 ml etanolu (3.1), približne 100 mg BHT (3.12), 2 ml roztoku askorbátu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Pripevnite chladič (4.3) k banke a ponorte banku do vodného kúpeľa s magnetickým miešaním (4.7). Zahrejte až do varu a nechajte 5 minút refluxovať. Potom pridajte cez chladič (4.3) 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) a nechajte refluxovať ďalších 25 minút za miešania pod slabým prúdom dusíka. Potom chladič vypláchnite približne 20 ml vody a ochlad'te obsah banky na laboratórnu teplotu.

▼B**5.3. Extrakcia**

Po dekantácii a po premytí celkovým objemom 250 ml vody zmydelnený roztok kvantitatívne preneste do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3) alebo do extrakčnej aparatury (4.8). Vymyte zmydelňovaciu banku postupne 25 ml etanolu (3.1) a 100 ml petroléru (3.2) a preneste tieto kvapaliny do oddeľovacieho lievika alebo do extrakčnej aparatury. Pomer vody a etanolu v zmiešanom roztoku musí byť okolo 2 : 1. Oddeľovacím lievikom intenzívne pretrepávajte 2 minúty a potom nechajte 2 minúty usadiť.

5.3.1. Extrakcia s použitím oddeľovacieho lievika (4.2.3)

Po oddelení vrstiev (pozri poznámku 7.3) preneste vrstvu petroléru do ďalšieho oddeľovacieho lievika (4.2.3). Zopakujte túto extrakciu dvakrát so 100 ml petroléru (3.2) a dvakrát s 50 ml petroléru (3.2).

Spojené extrakty premyte dvakrát 100 ml vody v oddeľovacom lieviku miernym krúžením (aby sa zabránilo vytvoreniu emulzie) a potom opakovaným pretrepaním ďalšími 100 ml vody, až kým voda nezostane po pridaní roztoku fenolftaleínu (3.7) bezfarebná (premytie štyrikrát zvyčajne postačuje). Premytý extrakt prefiltrujte do 500 ml odmernej banky (4.2.2) cez suchý skladaný filter na fázovú separáciu (4.4), aby sa odstránila všetka suspendovaná voda. Oddeľovací lievok a filter opláchnite 50 ml petroléru (3.2), banku doplňte po značku petrolérom (3.2) a dobre zamiešajte.

5.3.2. Extrakcia v extrakčnej aparature (4.8)

Po oddelení vrstiev (pozri poznámku 7.3) vymeňte zátku skleneného valca (4.8.1) za sklenenú vložku so zábrusom (4.8.2) a nastavte spodný koniec nastaviteľnej rúrky v tvare písmena U tak, aby bol tesne nad hladinou. Pomocou tlaku dusíka do bočného ramena preneste hornú vrstvu petroléru do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3). Do skleneného valca pridajte 100 ml petroléru (3.2), zazátkujte a dobre premiešajte. Nechajte oddeliť vrstvy a hornú vrstvu preneste opäť do oddeľovacieho lievika. Opakujte extrakciu ďalšími 100 ml petroléru (3.2), potom dvakrát po 50 ml petroléru (3.2) a vrstvy petroléru pridajte do oddeľovacieho lievika.

Spojené extrakty petroléru premyte postupom opísaným v bode 5.3.1 a ďalej postupujte podľa tohto bodu.

5.4. Príprava roztoku vzorky pre HPLC

Alikvotnú časť roztoku petroléru (z 5.3.1. alebo 5.3.2) napipetujte do 250 ml hruškovitej banky (4.2.4). Odparte rozpúšťadlo takmer dosucha v rotačnej vákuovej odparke (4.1) za zníženého tlaku pri teplote kúpeľa nepresahujúcej 40 °C. Obnovte atmosférický tlak vpustením dusíka (3.9) a vyberte banku z rotačnej odparky. Odstráňte zvyšné rozpúšťadlo prúdom dusíka (3.9) a zvyšok ihneď rozpustite v známom objeme (10 – 100 ml) metanolu (3.3) (koncentrácia vitamínu E musí byť v rozsahu od 5 µg/ml do 30 µg/ml).

5.5. Stanovenie HPLC

Vitamín E sa oddelí na reverznej fáze kolóny C₁₈ (4.5.1) a koncentrácia sa zmeria fluorescenčným detektorom (excitácia: 295 nm, emisía: 330 nm) alebo UV detektorom (292 nm) (4.5.2).

▼B

Vstreknite alikvotnú časť (napr. 20 µl) roztoku metanolu získaného podľa bodu 5.4 a vymyte mobilnou fázou (3.8). Vypočítajte priemernú výšku (plochu) píku niekoľkých nástrekov roztoku tej istej vzorky a priemernú výšku (plochu) píku niekoľkých nástrekov kalibračných roztokov (5.6.2).

Podmienky HPLC

Odporúčané sú nasledovné podmienky; iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov.

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.5.1):	250 mm × 4 mm, s náplňou C ₁₈ 5 µm alebo ekvivalentná
Mobilná fáza (3.8):	zmes metanolu (3.3) a vody napr. 980 + 20 (v + v).
Prietoková rýchlosť:	1 – 2 ml/min
Detektor (4.5.2):	fluorescenčný detektor (excitácia: 295 nm, emisia: 330 nm) alebo UV detektor (292 nm)

5.6. Kalibrácia (DL- α -tokoferol acetát alebo DL- α -tokoferol)

5.6.1. Štandard DL- α -tokoferol acetátu

5.6.1.1. Príprava pracovného štandardného roztoku

Do 500 ml banky s rovným dnom alebo do kužeľovej banky (4.2.1) napipetujte 25 ml zásobného roztoku DL- α -tokoferol acetátu (3.10.1) a hydrolyzujte podľa bodu 5.2. Následne extrahujte petroleterom (3.2) podľa bodu 5.3 a doplňte petroleterom na 500 ml (3.2). Odparte 25 ml tohto roztoku na rotačnej odparke (pozri bod 5.4) takmer dosucha, odstráňte zvyšné rozpúšťadlo prúdom dusíka (3.9) a zvyšok opäť rozpustíte v 25,0 ml metanolu (3.3). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 45,5 µg DL- α -tokoferol acetátu na ml. Pracovný štandardný roztok sa musí pripravovať čerstvý tesne pred použitím.

5.6.1.2. Príprava kalibračných roztokov a kalibračný graf

Do 20 ml odmerných baniek postupne preneste 1,0, 2,0, 5,0 a 10,0 ml pracovného štandardného roztoku, doplňte metanolom po značku (3.3) a zamiešajte. Nominálne koncentrácie týchto roztokov sú 2,28, 4,55, 9,10 a 22,8 µg/ml DL- α -tokoferolu.

Niekoľkokrát vstreknite 20 µl každého kalibračného roztoku a stanovte priemernú výšku (plochu) píku. Z priemerných výšok (plôch) píkov zostrojte kalibračný graf.

5.6.1.3. UV štandardizácia zásobného roztoku DL- α -tokoferol acetátu (3.10.1).

Zriedte 5,0 ml zásobného roztoku DL- α -tokoferol acetátu (3.10.1) na 25,0 ml etanolom a zmerajte UV spektrum tohto roztoku proti etanolu (3.1) v spektrofotometri (4.6) v rozmedzí 250 nm a 320 nm

Absorbčné maximum má byť pri 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ pri } 284 \text{ nm v etanole}$$

Pri tomto zriedení sa musí dosiahnuť extinkčná hodnota 0,84 až 0,88.

▼B**5.6.2. Štandard DL- α -tokoferol acetátu****5.6.2.1. *Príprava pracovného štandardného roztoku***

Do 50 ml odmernej banky napipetujte 2 ml zásobného roztoku DL- α -tokoferolu (3.11.1), rozpustite v metanole (3.3) a doplňte objem metanolom po značku. Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 40 μg DL- α -tokoferolu na ml, čo zodpovedá 44,0 μg DL- α -tokoferol acetátu na ml. Pracovný štandardný roztok sa musí pripravovať čerstvý tesne pred použitím.

5.6.2.2. *Príprava kalibračných roztokov a kalibračný graf*

Do 20 ml odmerných baniek preneste postupne 1,0, 2,0, 4,0 a 10,0 ml pracovného štandardného roztoku, doplňte metanolom po značku (3.3) a zamiešajte. Nominálne koncentrácie týchto roztokov sú 2,0, 4,0, 8,0 a 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferolu, t. j. 2,20, 4,40, 8,79 a 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferol acetátu.

Vstreknite 20 μl každého kalibračného roztoku niekoľkokrát a stanovte priemernú výšku (plochu) píku. Z priemerných výšok (plôch) pík zostrojte kalibračný graf.

5.6.2.3. *UV štandardizácia zásobného roztoku DL- α -tokoferolu (3.11.1).*

Zriedte 2,0 ml zásobného roztoku DL- α -tokoferolu (3.11.1) na 25,0 ml etanolom a zmerajte UV spektrum tohto roztoku proti etanolu (3.1) v spektrofotometri (4.6) v rozmedzí 250 nm a 320 nm. Absorpčné maximum má byť pri 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ pri } 292 \text{ nm v etanole}$$

Pri tomto zriedení sa má dosiahnuť extinkčná hodnota 0,6.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku vitamínu E v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v $\mu\text{g}/\text{ml}$ (vypočítanú ako α -tokoferol acetát) porovnaním s kalibračným grafom (5.6.1.2 alebo 5.6.2.2).

Obsah w vitamínu E v mg/kg vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

c = koncentrácia vitamínu E (ako α -tokoferol acetát) roztoku vzorky (5.4) v $\mu\text{g}/\text{ml}$,

V_1 = objem roztoku vzorky (5.4) v ml,

V_2 = objem odobratej alikvotnej časti (5.4) v ml,

m = hmotnosť navážky vzorky v g.

7. Poznámky

7.1. V prípade vzoriek s nízkou koncentráciou vitamínu E sa odporúča spojiť extrakty petroleteru z dvoch dávok po zmydelnení (navážované množstvo: 25 g) do jedného roztoku vzorky pre stanovenie HPLC.

7.2. Navážka vzorky odobratej na analýzu nemá obsahovať viac ako 2 g tuku.

7.3. Ak nedôjde k oddeleniu fáz, pridajte približne 10 ml etanolu (3.1) aby sa narušila emulzia.

▼B

- 7.4. Po spektrofotometrickom zmeraní roztoku DL- α -tokoferol acetátu alebo DL- α -tokoferolu podľa bodov 5.6.1.3 alebo 5.6.2.3 pridajte do roztoku (3.10.1 alebo 3.10.2) približne 10 mg BHT (3.12) a roztok nechajte v chladničke (skladovateľnosť maximálne 4 týždne).
- 7.5. Namiesto BHT sa môže sa použiť hydrochinón
- 7.6. Použitím kolóny s normálnou fázou je možné oddeliť α -, β -, γ a δ -tokoferol.
- 7.7. Namiesto roztoku askorbátu sodného sa môže použiť približne 150 mg kyseliny askorbovej.
- 7.8. Namiesto roztoku sulfidu sodného sa môže použiť približne 50 mg EDTA.
- 7.9. Vitamín E acetát sa hydrolyzuje veľmi rýchlo v alkalickom prostredí, a preto je veľmi citlivý na oxidáciu najmä v prítomnosti mikroprvkov, ako sú železo a meď. Následkom toho v prípade stanovenia vitamínu E v premixoch pri množstvách vyšších ako 5 000 mg/kg by mohlo dôjsť k degradácii vitamínu E. Preto sa na potvrdenie odporúča metóda HPLC, ktorá zahŕňa enzymatický rozklad zlúčenín vitamínu E bez alkalického zmydelňovania.
8. **Opakovateľnosť**
- Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 15 % relatívnych z vyššieho výsledku
9. **Výsledky medzilaboratórnej štúdie ⁽¹⁾**

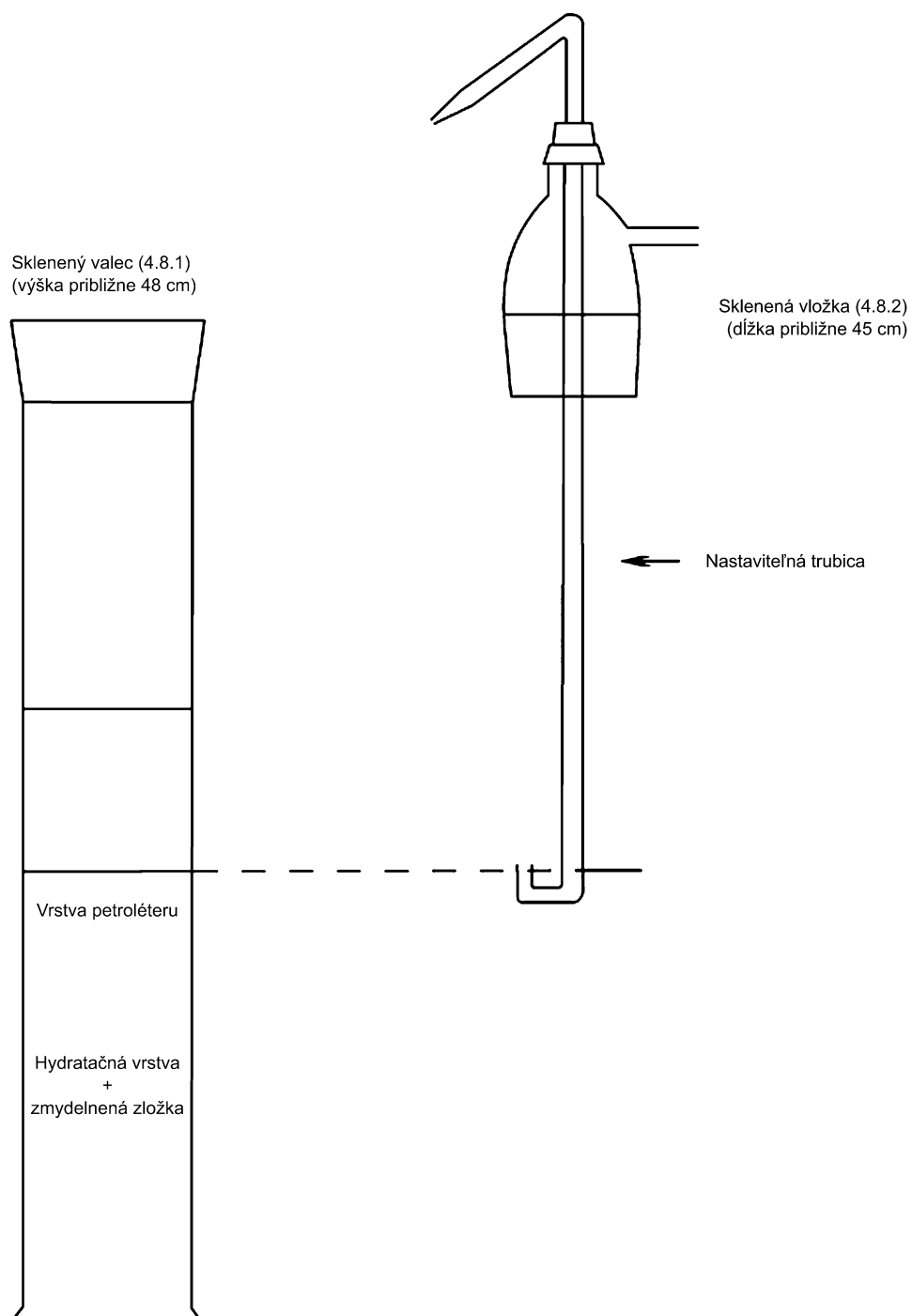
	Premix	Premixové krmivo	Minerálny koncentrát	Bielkovinové krmivo	Krmivo pre prasiatka
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
priemer [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [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 = počet laboratórií
n = počet jednotlivých hodnôt
s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti
s_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti
r = opakovateľnosť
R = reprodukovateľnosť
CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti
CVR = variačný koeficient reprodukovateľnosti

⁽¹⁾ Vykonala pracovná skupina v oblasti krmív Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Obrázok 1: Extrakčná aparatúra (4.8)



▼B**C. STANOVENIE MIKROPRVKOV ŽELEZA, MEDI, MANGÁNU A ZINKU****1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah mikroprvkov železa, medi, mangánu a zinku v krmivách. Kvantifikačné limity sú tieto:

- železo (Fe): 20 mg/kg
- meď (Cu): 10 mg/kg
- mangán (Mn): 20 mg/kg
- zinok (Zn): 20 mg/kg

2. Podstata metódy

Vzorka sa po spálení organických látok, ak nejaké obsahuje, ponorí do roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Obsah prvkov železa, medi, mangánu a zinku sa stanoví po vhodnom zriedení metódou atómovej absorpčnej spektrometrie.

3. Chemikálie*Úvodné poznámky*

Na prípravu chemikálií a analytických roztokov používajte vodu, ktorá bola získaná dvojitou destiláciou vody v destilačnom prístroji z borokremičitého skla alebo kremeňa, príp. dvojitou úpravou na iónomeničovej živici, a ktorá neobsahuje kationy prvkov, ktorých obsah sa má stanoviť.

Chemikálie musia mať aspoň analytickú triedu čistoty. Neprítomnosť prvku, ktorého obsah sa má stanoviť, sa musí overiť slepým pokusom. V prípade potreby sa chemikálie musia ďalej vyčistiť

Namiesto štandardných roztokov opísaných nižšie je možné použiť komerčné štandardné roztoky za predpokladu, že sú certifikované a boli pred použitím skontrolované.

- 3.1. Kyselina chlorovodíková (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Kyselina chlorovodíková (6 mol/liter).
- 3.3. Kyselina chlorovodíková (0,5 mol/liter).
- 3.4. Kyselina fluorovodíková 38 až 40 % (v/v) s obsahom železa (Fe) nižším ako 1 mg/liter a zvyšku po odparení menej ako 10 mg (vo forme síranu)/liter.
- 3.5. Kyselina sírová (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Peroxid vodíka [približne 100 objemových jednotiek kyslíka (30 % podľa hmotnosti)].
- 3.7. Štandardný roztok železa (1 000 µg Fe/ml) pripravený podľa nasledujúceho postupu, príp. ekvivalentný komerčne dostupný roztok: rozpustíte 1 g železného drôtu v 200 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2), pridajte 16 ml peroxidu vodíka (3.6) a objem doplňte vodou na 1 liter.
 - 3.7.1. Pracovný štandardný roztok železa (100 µg Fe/ml) pripravený zriedením štandardného roztoku (3.7) vodou v pomere 1 diel roztoku k 9 dielom vody.
- 3.8. Štandardný roztok medi (1 000 µg Cu/ml) pripravený podľa nasledujúceho postupu, príp. ekvivalentný komerčne dostupný roztok:
 - rozpustíte 1 g medi vo forme prášku v 25 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2), pridajte 5 ml peroxidu vodíka (3.6) a objem doplňte vodou na 1 liter.
- 3.8.1. Pracovný štandardný roztok medi (100 µg Cu/ml) pripravený zriedením štandardného roztoku (3.8) vodou v pomere 1 diel roztoku k 9 dielom vody a následne zriedením výsledného roztoku vodou v pomere 1 diel výsledného roztoku k 9 dielom vody.

▼B

- 3.9. Štandardný roztok mangánu (1 000 µg Mn/ml) pripravený podľa nasledujúceho postupu, príp. ekvivalentný komerčne dostupný roztok:

— rozpustíte 1 g mangánu vo forme prášku v 25 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) a objem doplníte vodou na 1 liter.

- 3.9.1. Pracovný štandardný roztok mangánu (10 µg Mn/ml) pripravený zriedením štandardného roztoku (3.9) vodou v pomere 1 diel roztoku k 9 dielom vody a následne zriedením výsledného roztoku vodou v pomere 1 diel výsledného roztoku k 9 dielom vody.

- 3.10. Štandardný roztok zinku (1 000 µg Zn/ml) pripravený podľa nasledujúceho postupu, príp. ekvivalentný komerčne dostupný roztok:

— rozpustíte 1 g zinku vo forme pásu alebo fólie v 25 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) a objem doplníte vodou na 1 liter.

- 3.10.1. Pracovný štandardný roztok zinku (10 µg Zn/ml) pripravený zriedením štandardného roztoku (3.10) vodou v pomere 1 diel roztoku k 9 dielom vody a následne zriedením výsledného roztoku vodou v pomere 1 diel výsledného roztoku k 9 dielom vody.

- 3.11. Roztok chloridu lantanitého: rozpustíte 12 g oxidu lantanitého v 150 ml vody, pridajte 100 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) a objem doplníte vodou na 1 liter.

4. Prístrojové vybavenie

- 4.1. Muflová pec s reguláciou teploty a prednostne so zapisovačom.
- 4.2. Sklené predmety musia byť tvrdého borokremičitého typu a odporúča sa používať prístrojové vybavenie vyhradené výlučne na stanovenie mikroprvkov.
- 4.3. Atómový absorpčný spektrometer spĺňajúci požiadavky metódy, pokiaľ ide o citlivosť a presnosť v požadovanom rozsahu.

5. Postup ⁽¹⁾

- 5.1. *Vzorky s obsahom organických látok*

- 5.1.1. Spopolnenie a príprava roztoku na analýzu ⁽²⁾

- 5.1.1.1. Vložte 5 až 10 g vzorky odváženej s presnosťou na 0,2 mg do kremenného alebo platinového téglika (pozri poznámku b), vysušte v sušiarňi pri 105 °C a vložte téglik do studenej muflovej pece (4.1). Zatvorte pec [pozri poznámku c)] a v priebehu asi 90 minút postupne zvyšujte teplotu na 450 až 475 °C. Túto teplotu udržiavajte 4 až 16 hodín (napr. cez noc), aby sa odstránil uhľikátý materiál, a potom pec otvorte a nechajte vychladnúť [pozri poznámku d)].

⁽¹⁾ Môžu sa použiť iné metódy digestie za predpokladu, že sa dokázalo, že majú podobné výsledky (ako mikrovlnná tlaková digestia).

⁽²⁾ Zelené krmivo (čerstvé alebo sušené) môže obsahovať veľké množstvá kremičitanu, v ktorom sa môžu uchovávať mikroprvky a ktorý sa musí odstrániť. V prípade vzoriek týchto krmív sa preto musí postupovať podľa nasledujúceho upraveného postupu: vykonajte krok 5.1.1.1 po filtrácii. Dvakrát premyte filtračný papier obsahujúci nerozpustné rezíduum vriacou vodou a vložte ho do kremenného alebo platinového téglika. Spaľujte v muflovej peci (4.1) pri teplote pod 550 °C, kým sa všetok uhľikátý materiál úplne nestratí. Nechajte vychladnúť, pridajte niekoľko kvapiek vody, potom 10 až 15 ml kyseliny fluorovodíkovej (3.4) a odparte dosucha pri teplote približne 150 °C. Ak vo zvyšku zostane akýkoľvek kremičitan, znovu ho rozpustíte v niekoľkých mililitroch kyseliny fluorovodíkovej (3.4) a odparte dosucha. Pridajte päť kvapiek kyseliny sírovej (3.5) a zahrievajte, kým sa neprestanú uvoľňovať biele výpary. Po pridaní 5 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) a približne 30 ml vody tento roztok zahrejte, prefiltrujte ho do 250 ml odmernej banky a doplnite po značku vodou (koncentrácia chlorovodíka približne 0,5 mol/l). Ďalej pokračujte v postupe stanovenia obsahu mikroprvkov od bodu 5.1.2.

▼B

Popol zvlhčíte vodou a preneste do kadičky o objeme 250 ml. Vymyte téglík približne 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) a pomaly a opatrne pridávajte kyselinu do kadičky (v dôsledku tvorby CO_2 môže vzniknúť prudká reakcia). Pridávajte kyselinu chlorovodíkovú (3.1) po kvapkách za miešania, kým roztok celkom neprestane šumieť. Odparujte dosucha za občasného premiešania sklenenou tyčinkou.

Následne pridajte 15 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) k zvyšku a potom asi 120 ml vody. Premiešajte sklenenou tyčinkou, ktorá musí ostať v kadičke a kadičku zakryte hodinovým sklíčkom. Pomaly uveďte do varu a udržiavajte na bode varu dovtedy, kým neuvidíte, že sa už žiadny ďalší popol nerozpúšťa. Prefiltrujte na bezpopolovom filtračnom papieri a filtrát zachyťte v 250 ml odmernej banke. Kadičku a filter premyte 5 ml horúcej 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2) a dvakrát vriacou vodou. Naplňte odmernú banku po značku vodou (koncentrácia HCl približne 0,5 mol/liter).

- 5.1.1.2. Ak je zvyšok na filtračnom papieri čierny (uhlík), vráťte ho späť do pece a znovu ho spopolnite pri teplote 450 až 475 °C. Toto spopolnenie, ktoré trvá iba niekoľko hodín (asi tri až päť), sa skončí, keď je popol biely alebo takmer biely. Rozpusťte zvyšok asi v 2 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), odparte dosucha a pridajte 5 ml 6 mol/liter kyseliny chlorovodíkovej (3.2). Roztok ohrejte, prefiltrujte ho do odmernej banky a dolejte vodu až po značku (koncentrácia HCl približne 0,5 mol/liter).

Poznámky:

- a) Pri stanovovaní obsahu mikroprvkov je dôležité pripraviť sa na riziká kontaminácie, najmä zinkom, meďou a železom. Z tohto dôvodu sa tieto kovy nesmú nachádzať na vybavení používanom pri príprave vzoriek.

Kvôli zníženiu všeobecného rizika kontaminácie pracujte v bezprašnej atmosfére s úzkostlivo čistým vybavením a starostlivo poumývanými sklenými pomôckami. Stanovenie obsahu zinku je obzvlášť citlivé na mnoho typov kontaminácie, napr. zo sklenených predmetov, chemikáliami, prachom atď.

- b) Hmotnosť vzorky, ktorá sa má spopolniť, sa vypočíta z približného obsahu mikroprvku v krmive vzhľadom na citlivosť použitého spektrofotometra. Pri určitých krmivách s nízkym obsahom mikroprvkov môže byť potrebné začať s 10 až 20 g vzorkou a doplniť objem konečného roztoku len na 100 ml.
- c) Spopolnenie sa musí vykonať v uzavretej peci bez prívodu vzduchu alebo kyslíka.
- d) Teplota, ktorú udáva pyrometer, nesmie prekročiť 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometrické stanovenie

5.1.2.1. Príprava kalibračných roztokov

Pre každý z prvkov, ktorého obsah sa má stanoviť, pripravte z pracovných štandardných roztokov uvedených v bodoch 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 a 3.10.1 niekoľko kalibračných roztokov, pričom koncentrácia HCl v každom kalibračnom roztoku bude asi 0,5 mol/liter a (v prípade železa, mangánu a zinku) koncentrácia chloridu lantanitého bude ekvivalentná 0,1 % La (w/v).

Vybrané koncentrácie mikroprvkov sa musia nachádzať v rozsahu citlivosti použitého spektrofotometra. V ďalej uvedených tabuľkách je formou príkladov opísané zloženie typických rozsahov kalibračných roztokov; v závislosti od typu a citlivosti použitého spektrofotometra však môže byť potrebné zvoliť iné koncentrácie.

▼ B**Železo**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml pracovného štandardného roztoku (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lantanitého (3.11) a objem doplňte vodou na 100 ml							

Med'

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml pracovného štandardného roztoku (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangán

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml pracovného štandardného roztoku (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lantanitého (3.11) a objem doplňte vodou na 100 ml							

Zinok

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml pracovného štandardného roztoku (3.9.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lantanitého (3.11) a objem doplňte vodou na 100 ml							

5.1.2.2. Príprava roztoku na analýzu

Na stanovenie medi je za bežných okolností možné priamo použiť roztok pripravený postupom podľa bodu 5.1.1. V prípade, že bude potrebné dosiahnuť jeho koncentráciu tak, aby bola v medziach kalibračných roztokov, môže sa alikvotná časť preniesť pomocou pipety do 100 ml odmernej banky a objem doplniť 0,5 mol/l kyselinou chlorovodíkovou (3.3) po značku.

Na stanovenie obsahu železa, mangánu a zinku preneste pipetou alikvotnú časť roztoku pripraveného podľa bodu 5.1.1 do 100 ml odmernej banky, pridajte 10 ml roztoku chloridu lantanitého (3.11) a dolejte po značku 0,5 mol/liter kyselinu chlorovodíkovú (3.3) (pozri tiež bod 8 „Poznámky“).

5.1.2.3. Slepý pokus

Súčasťou slepého pokusu musia byť všetky predpísané kroky postupu s tým, že sa vynecháva materiál vzorky. Ako slepý roztok sa nesmie použiť kalibračný roztok „0“.

5.1.2.4. Meranie atómovej absorpcie

Odmerajte atómovú absorpciu kalibračných roztokov a analyzovaného roztoku pomocou plameňa acetylén-vzduch pri týchto vlnových dĺžkach:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Každé meranie vykonajte štyrikrát.

5.2. *Minerálne krmivá*

Ak vzorka neobsahuje žiadne organické látky, nie je potrebné ju vopred spopolniť. Postupujte podľa bodu 5.1.1.1 a začnite od druhého odseku. Odparovanie roztoku s kyselinou fluorovodíkovou sa môže vynechať.

6. **Výpočet výsledkov**

Pomocou kalibračnej krivky vypočítajte koncentráciu mikroprvku v analyzovanom roztoku a výsledok vyjadrite v miligramoch mikroprvku na kilogram vzorky (ppm).

7. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým analytikom nesmie presiahnuť:

- 5 mg/kg v absolútnej hodnote, pre obsah príslušného mikroprvku do 50 mg/kg,
- 10 % z vyššej hodnoty výsledku pre obsah príslušného mikroprvku od 50 do 100 mg/kg,
- 10 mg/kg v absolútnej hodnote, pre obsah príslušného mikroprvku od 100 do 200 mg/kg,
- 5 % z vyššej hodnoty výsledku pre obsah príslušného mikroprvku nad 200 mg/kg.

8. **Poznámky**

Prítomnosť veľkých množstiev fosfátov môže ovplyvniť stanovovanie železa, mangánu a zinku. Takáto interferencia sa musí korigovať pridaním roztoku chloridu lantanitého (3.11). Ak je však vo vzorke pomer hmotnosti Ca + Mg/P > 2, môže sa pridanie roztoku chloridu lantanitého (3.11) do roztoku na analýzu a do kalibračných roztokov vynechať

D. STANOVENIE HALOFUGINONU

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-chinazolin-4-(3H)-hydrobromid

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah halofuginonu v krmivách. Kvantifikačný limit je 1 mg/kg.

2. **Podstata metódy**

Po úprave horúcou vodou sa halofuginon extrahuje ako voľná zásada do octanu etylnatého a následne sa oddelí vo forme hydrochloridu do vodného roztoku kyseliny. Extrakt sa prečistí iónovo-výmennou chromatografiou. Obsah halofuginonu sa stanoví vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) na reverznej fáze pomocou UV detektora.

3. **Chemikálie**

- 3.1. Acetonitril, čistoty HPLC
- 3.2. Živica amberlitu XAD – 2
- 3.3. Octan amónny
- 3.4. Octan etylnatý
- 3.5. Kyselina octová, ľadová

▼B

3.6. Štandard halofuginonu (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]- chinazolin-4-(3H)- hydrobromid, E 764)

3.6.1. Štandardný zásobný roztok halofuginonu, 100 µg/ml

Navážte 50 mg halofuginonu (3.6) s presnosťou na 0,1 mg do 500 ml odmernej banky, rozpustite v tlmivom roztoku octanu amónneho (3.18), doplňte po značku tlmivým roztokom a premiešajte. Tento roztok je stály počas troch týždňov pri teplote 5 °C, ak je uložený v tme.

3.6.2. Kalibračné roztoky

Do série 100 ml odmerných baniek preneste 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 ml štandardného zásobného roztoku (3.6.1). Doplňte po značku mobilnou fázou (3.21) a zmiešajte. Koncentrácia halofuginonu v týchto roztokoch je 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 µg/ml. Tieto roztoky sa musia pripraviť čerstvo pred použitím.

3.7. Kyselina chlorovodíková, (ρ_{20} približne 1,16 g/ml)

3.8. Metanol

3.9. Dusičnan strieborný

3.10. Askorbát sodný

3.11. Uhličitan sodný

3.12. Chlorid sodný

3.13. EDTA (disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej)

3.14. Voda, čistoty HPLC

3.15. Roztok uhličitanu sodného $c = 10$ g/100 ml.

3.16. Roztok uhličitanu sodného nasýteného chloridom sodným, $c = 5$ g/100 ml

Rozpusťte 50 g uhličitanu sodného (3.11) vo vode, doplňte vodou na 1 liter a pridávajte chlorid sodný (3.12), kým sa roztok nenасыtí.

3.17. Kyselina chlorovodíková, približne 0,1 mol/l.

Zriedte 10 ml HCl (3.7) s vodou na objem 1 litra.

3.18. Tlmivý roztok octanu amónneho, približne 0,25 mol/l.

Rozpusťte 19,3 g octanu amónneho (3.3) a 30 ml kyseliny octovej (3.5) vo vode (3.14) a doplňte vodou na 1 l.

3.19. Príprava živice amberlitu XAD-2

Premývajte vodou vhodné množstvo amberlitu (3.2), kým neodstránite všetky ióny chloridu, čo sa overí skúškou dusičnanom strieborným (3.20), skúšku vykonajte v odstránenej vodnej fáze. Potom premyte živicu 50 ml metanolu (3.8), odstráňte metanol a živicu uchovávajte pod čerstvým metanolom.

3.20. Roztok dusičnanu strieborného, približne 0,1 mol/l

Rozpusťte 0,17 g dusičnanu strieborného (3.9) v 10 ml vody.

3.21. Mobilná fáza HPLC:

Zmiešajte 500 ml acetonitrilu (3.1) s 300 ml tlmivého roztoku octanu amónneho (3.18) a s 1 200 ml vody (3.14). Upravte pH na 4,3 pomocou kyseliny octovej (3.5). Prefiltrujte cez 0,22 µm filter (4.8) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút). Tento roztok je stály počas jedného mesiaca, ak je uložený v tme a v uzatvorenej nádobe.

▼ B**4. Prístrojové vybavenie**

- 4.1. Ultrazvukový kúpeľ
- 4.2. Filmová rotačná odparka
- 4.3. Odstredivka
- 4.4. HPLC prístroj s ultrafialovým detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s detektorom diódového poľa.
- 4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 300 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 10 µm alebo ekvivalentná
- 4.5. Sklenená kolóna (300 mm × 10 mm) vybavená sklenenou filtračnou fritou a uzatváracím kohútom
- 4.6. Filtre so sklenými vláknami, priemer 150 mm
- 4.7. Membránové filtre, 0,45 µm
- 4.8. Membránové filtre, 0,22 µm

5. Postup

Poznámka Halofuginon je ako voľná zásada nestály v alkalických roztokoch a v roztokoch obsahujúcich octan etylnatý. V octane etylnatom nesmie zostať dlhšie ako 30 minút.

5.1. Všeobecné pokyny

- 5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva, v ktorom nesmie byť prítomný ani halofuginon, ani interferujúce látky.
- 5.1.2. Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo halofuginonu, aké sa nachádza vo vzorke. K príprave vzorky o obsahu halofuginonu 3 mg/kg pridajte 300 µl štandardného zásobného roztoku (3.6.1) do 10 g slepej vzorky krmiva, premiešajte a počkajte 10 minút, kým začnete s extrakciou (5.2).

Poznámka: Na účely tejto metódy slepá vzorka krmiva musí byť typovo podobná vzorke skúšanej a pri analýze v nej nesmie byť zistená prítomnosť halofuginonu.

5.2. Extrakcia

Do odstredivkovej skúmavky s objemom 200 ml navážte 10 g pripravenej vzorky s presnosťou na 0,1 g, pridajte 0,5 g askorbátu sodného (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) a 20 ml vody a premiešajte. Skúmavku ponorte na 5 minút do vodného kúpeľa (80 °C). Po ochladení na laboratórnu teplotu pridajte 20 ml roztoku uhličitanu sodného (3.15) a premiešajte. Okamžite pridajte 100 ml octanu etylnatého (3.4) a intenzívne pretrepávajte rukou počas 15 sekúnd. Potom umiestnite skúmavku na tri minúty do ultrazvukového kúpeľa (4.1) bez zátky. Odstred'ujte počas dvoch minút a prelejte octanovú fázu cez filter so sklenenými vláknami (4.6) do 500 ml oddeľovacieho lievika. Zopakujte extrakciu vzorky s ďalšou 100 ml dávkou octanu etylnatého. Spojené extrakty premývajte počas jednej minúty 50 ml roztoku uhličitanu sodného nasýteného chloridom sodným (3.16) a odstráňte vodnú vrstvu.

Extrahujte organickú vrstvu počas 1 minúty pomocou 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.17). Spodnú vrstvu kyseliny zlejte do 250 ml oddeľovacieho lievika. Znovu extrahujte organickú vrstvu počas 1,5 minúty pomocou ďalších 50 ml kyseliny chlorovodíkovej a zmiešajte s prvým extraktom. Spojené kyselinové extrakty premývajte asi počas 10 sekúnd 10 ml octanu etylnatého (3.4) vírivým pohybom.

▼B

Kvantitatívne preneste vodnú vrstvu do 250 ml banky s guľatým dnom a odstráňte organickú fázu. Odparte všetok zvyšný octan etylnatý z kyselínového roztoku pomocou filmovej rotačnej odparky (4.2). Teplota vodného kúpeľa nemá presiahnuť 40 °C. Vo vákuu cca 25 mbar sa všetok zvyšný octan etylnatý odstráni do 5 minút pri teplote 38 °C.

5.3. *Prečistenie*5.3.1. *Príprava kolóny s amberlitom*

Kolóna XAD-2 sa pripravuje pre každý extrakt vzorky. Vložte 10 g pripraveného amberlitu (3.19) do sklenenej kolóny (4.5) s metanolom (3.8). Pridajte malý kúsok sklenej vaty do hornej časti živicového stĺpca. Vypustite metanol z kolóny a premyte živicu 100 ml vody, pričom vypúšťanie zastavte, keď kvapalina dosiahne vrch živicového stĺpca. Pred použitím nechajte kolónu stáť 10 minút, aby sa dosiahla rovnováha. Nikdy nenechajte kolónu vyschnúť.

5.3.2. *Prečistenie vzorky*

Preneste extrakt (5.2) kvantitatívne do hornej časti pripraveného stĺpca amberlitu (5.3.1), spustíte vymývanie a eluát vylejte. Rýchlosť vymývania nemá presiahnuť 20 ml/min. Vypláchnite banku s guľatým dnom 20 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.17), ktorou neskôr premyte stĺpec živice. Všetok zvyšný kyselinový roztok odstráňte pomocou prúdu vzduchu. Premývacie kvapaliny vylejte. Pridajte na kolónu 100 ml metanolu (3.8), nechajte vymývať 5 až 10 ml, eluát zachyťte do 250 ml banky s guľatým dnom. Zvyšný metanol nechajte spolupôsobiť so živcou 10 minút, aby sa dosiahla rovnováha, pokračujte vo vymývaní s rýchlosťou nepresahujúcou 20 ml/min., eluát zachyťte do tej istej banky s guľatým dnom. Odparte metanol na filmovej rotačnej odparke (4.2), pričom teplota vodného kúpeľa nesmie presiahnuť 40 °C. Rozpusťte zvyšok v mobilnej fáze (3.21) a kvantitatívne preneste do 10 ml odmernej banky. Dopĺňte po značku mobilnou fázou a premiešajte. Prefiltrujte alikvotnú časť cez membránový filter (4.7). Tento roztok si nechajte na stanovenie pomocou HPLC (5.4).

5.4. *Stanovenie HPLC*5.4.1. *Parametre*

Odporúčané sú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov.

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.4.1)

Mobilná fáza HPLC (3.21)

Prietoková rýchlosť: 1,5 až 2 ml/min.

Vlnová dĺžka pri meraní: 243 nm

Vstrekový objem: 40 až 100 µl.

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.6.2) obsahujúci 3,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky (alebo plochy) pík a konštantné retenčné časy.

5.4.2. *Kalibračný graf*

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.6.2) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) pík pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračný graf, pričom použite priemerné výšky alebo plochy pík kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

▼B**5.4.3. Roztok vzorky**

Niekoľkokrát nastreknite extrakt vzorky (5.3.2), pričom použite rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch a z nameraných píkov stanovte priemernú výšku (plochu) píku halofuginonu.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku halofuginonu v roztoku vzorky stanovte porovnaním s kalibračnou krivkou (5.4.2) koncentráciu halofuginonu vo vzorke v µg/ml.

Obsah w halofuginonu (mg/kg) sa vypočíta podľa vzorca:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kde:

c = koncentrácia halofuginonu v roztoku vzorky v µg/ml,

m = hmotnosť navážky vzorky v gramoch.

7. Validácia výsledkov**7.1. Zhodnosť**

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.6.2) obsahujúceho 6,0 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.6.2). Množstvo pridaného halofuginonu musí byť podobné odhadovanému množstvu halofuginonu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku halofuginonu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť v rozpätí ± 10 % pôvodnej šírky.

7.1.2. Detekcia pomocou diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorbie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obvyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm;
- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v častiach spektra medzi 225 a 300 nm v rozsahu od 10 % až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorbie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 225 až 300 nm v rozsahu 10 % až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak vo všetkých pozorovaných bodoch odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorbie spektra vrcholu píku.

▼ B

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, potom prítomnosť analytu nebola potvrdená.

7.2. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,5 mg/kg pre obsah halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. *Návratnosť*

V prípade slepej vzorky doplnenej o skúmanú látku musí byť atnosť najmenej 80 %.

8. **Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

Vykonal sa medzilaboratórna štúdia ⁽¹⁾, v rámci ktorej osem laboratórií analyzovalo tri vzorky.

Výsledky

	Vzorka A (slepá) pri prijatí	Vzorka B (sypká)		Vzorka C (granulovaná)	
		pri prijatí	po dvoch mesiacoch	pri prijatí	po dvoch mesiacoch
priemer [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
Návr. [%]		86	74	88	75

ND = nezistené

S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti (%)

Návr. = návratnosť (%)

E. STANOVENIE ROBENIDÍNU

1,3- bis [(4-chlórbenzylidén)amino]-guanidín-hydrochlorid

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah robenidínu v krmivách. Kvantifikačný limit je 5 mg/kg.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje okysleným metanolom. Extrakt sa vysuší a alikvotná časť sa podrobí čisteniu na kolóne oxidu hlinitého. Robenidín sa vymýva z kolóny metanolom, skoncentruje sa a doplní na vhodný objem mobilnou fázou. Obsah robenidínu sa stanoví na reverznej fáze vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) pomocou UV detektora.

3. **Chemikálie**

3.1. Metanol

3.2. Okyslený metanol

Do 500 ml odmernej banky preneste 4,0 ml kyseliny chlorovodíkovej ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml), doplňte po značku metanolom (3.1) a premiešajte. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvo pred použitím.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, str. 1 252 až 1 256.

▼B

3.3. Acetonitril, čistoty HPLC

3.4. Molekulové sito

Typ 3A, guľôčky, 8 – 12 mešov (guľôčky o veľkosti 1,6 – 2,5 mm, kryštalický hlinítokremičitan, priemer pórov 0,3 mm)

3.5. Oxid hlinitý, kyslý, aktivita triedy I pre stĺpcovú chromatografiu

Do vhodnej nádoby navážte 100 g oxidu hlinitého a pridajte 2,0 ml vody. Uzatvorte a pretrepávajte po dobu približne 20 minút. Uchovávajte v dobre uzatvorenej nádobe.

3.6. Roztok dihydrofosforečnanu draselného, $c = 0,025$ mol/l.

V 1 000 ml odmernej banke rozpustíte 3,40 g dihydrofosforečnanu draselného vo vode (čistoty HPLC), doplňte po značku vodou a premiešajte.

3.7. Roztok hydrofosforečnanu disodného, $c = 0,025$ mol/l

V litrovej odmernej banke rozpustíte 3,55 g bezvodého (alebo 4,45 g dihydrátu, príp. 8,95 g dodekahydrátu) hydrofosforečnanu disodného vo vode (čistoty HPLC), doplňte po značku vodou a premiešajte.

3.8. Mobilná fáza HPLC

Zmiešajte spolu tieto chemikálie:

650 ml acetonitrilu (3.3),

250 ml vody (čistoty HPLC),

50 ml roztoku dihydrofosforečnanu draselného (3.6),

50 ml roztoku hydrofosforečnanu disodného (3.7),

prefiltrujte cez 0,22 µm filter (4.6) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút).

3.9. Štandardná látka

Čistý robenidín: 1,3- bis [(4-chlórbenzylidén)amino]-guanidín-hydrochlorid.

3.9.1. Zásobný štandardný roztok robenidínu: 300 µg/ml

Navážte 30 mg štandardnej látky robenidínu (3.9) s presnosťou na 0,1 mg. Rozpusťte v okyslenom metanole (3.2) v 100 ml odmernej banke, doplňte po značku tým istým rozpúšťadlom a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte na tmavom mieste.

3.9.2. Pracovný štandardný roztok robenidínu: 12 µg/ml

Preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.9.1) do 250 ml odmernej banky, doplňte mobilnou fázou (3.8) po značku a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte na tmavom mieste.

3.9.3. Kalibračné roztoky

Do série 50 ml odmerných baniek preneste 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 a 25,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.9.2). Doplnite po značku mobilnou fázou (3.8) a premiešajte. Tieto roztoky obsahujú 1,2 µg, 2,4 µg, 3,6 µg, 4,8 µg a 6,0 µg robenidínu v 1 ml. Roztoky sa musia pripravovať čerstvo pred použitím.

3.10. Voda, čistoty HPLC

▼B**4. Prístrojové vybavenie****4.1. Sklenená kolóna**

Vyrobená z hnedého skla ukončená uzatváracím kohútom, zásobník s obsahom približne 150 ml, vnútorný priemer 10 – 15 mm, dĺžka 250 mm.

4.2. Mechanická trepačka alebo magnetická miešačka**4.3. Filmová rotačná odparka****4.4. Zariadenie na HPLC s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou, alebo s detektorom diódového poľa, pracujúci v rozsahu 250 až 400 nm.****4.4.1. Kolóna na vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu: 300 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 10 µm alebo ekvivalentná****4.5. Filtračný papier so sklenenými vláknami (Whatman GF/A alebo ekvivalentný)****4.6. Membráové filtre, 0,22 µm****4.7. Membráové filtre, 0,45 µm****5. Postup**

Poznámka: Robenidín je citlivý na svetlo. Pri všetkých operáciách sa majú používať nádoby z hnedého skla.

5.1. Všeobecné pokyny**5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva, v ktorej nesmie byť prítomný ani robenidín, ani interferujúce látky.****5.1.2. Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva (5.1.1), do ktorej bolo pridané obdobné množstvo robenidínu, aké sa nachádza vo vzorke. S cieľom obohatenia na úroveň 60 mg/kg preneste 3,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.9.1) do 250 ml kužeľovej banky. Roztok odparte na cca. 0,5 ml v prúde dusíka. Pridajte 15 g slepej vzorky, premiešajte a počkajte 10 minút pred extrakciou (5.2).**

Poznámka: Na účely tejto metódy musí byť slepá vzorka krmiva typovo podobná vzorke skúšanej a pri analýze v nej nesmie byť zistená prítomnosť robenidínu.

5.2. Extrakcia

Navážte približne 15 g pripravenej vzorky s presnosťou na 0,01 g. Preneste do 250 ml kužeľovej banky a pridajte 100,0 ml okysleného metanolu (3.2), zazátkujte a pretrepávajte jednu hodinu v trepačke (4.2). Roztok prefiltrujte cez filtračný papier so sklenenými vláknami (4.5) a celý filtrát zachyťte do 150 ml kužeľovej banky. Pridajte 7,5 g molekulového sita (3.4), zazátkujte a pretrepávajte päť minút. Obsah banky okamžite prefiltrujte cez filtračný papier so sklenenými vláknami. Tento roztok si nechajte na prečistenie (5.3).

5.3. Prečistenie**5.3.1. Príprava kolóny s oxidom hlinitým**

Do spodnej časti sklenej kolóny (4.1) vložte malú zátku zo sklenenej vaty a utlačte pomocou sklenenej tyčinky. Navážte 11,0 g pripraveného oxidu hlinitého (3.5) a preneste na kolónu. Počas tohto postupu treba minimalizovať vplyv atmosférického vzduchu. Jemne poklepte na spodnom konci kolóny, aby sa oxid hlinitý usadil.

▼B**5.3.2. Prečistenie vzorky**

Napipetujte 5,0 ml extraktu vzorky pripravenej podľa (5.2) a preneste na kolónu. Hrot pipety sa oprie tesne o stenu kolóny a roztok sa nechá vsiaknuť do oxidu hlinitého. Robenidín vymyte z kolóny použitím 100 ml metanolu (3.1), pri rýchlosti prietoku 2 – 3 ml/minútu, a eluát zachyťte do 250 ml banky s guľatým dnom. Roztok metanolu odparte do sucha pri zníženom tlaku a teplote 40 °C pomocou filmovej rotačnej odparky (4.3). Zvyšok po odparení rozpustíte v 3 – 4 ml mobilnej fázy (3.8) a kvantitatívne preneste do 10 ml odmernej banky. Banku vypláchnite niekoľkými 1 až 2 ml dávkami mobilnej fázy a tieto vyplachovacie roztoky preneste do odmernej banky. Doplnite po značku týmto roztokom a zmiešajte. Prefiltrujte alikvotnú časť cez 0,45 µm membránový filter (4.7). Tento roztok si nechajte na stanovenie pomocou HPLC (5.4).

5.4. Stanovenie HPLC**5.4.1. Parametre**

Odporúčané sú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov:

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.4.1)

Mobilná fáza HPLC (3.8)

Prietoková rýchlosť: 1,5 až 2 ml/min,

Vlnová dĺžka detektora: 317 nm,

Vstrekový objem: 20 až 50 µl.

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.9.3) obsahujúci 3,6 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky pík a konštantné retenčné časy.

5.4.2. Kalibračný graf

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.9.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) pík pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračný graf, pričom použite priemerné výšky vrcholov alebo plochy kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg na ml ako abscisy (os x).

5.4.3. Roztok vzorky

Niekoľkokrát nastreknite extrakt vzorky (5.3.2), pričom použite rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch a z nameraných pík stanovte priemernú výšku (plochu) píku robenidínu.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku robenidínu v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml pomocou kalibračnej krivky (5.4.2).

Obsah w robenidínu (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

c = koncentrácia robenidínu v roztoku vzorky v µg/ml,

m = hmotnosť navážky vzorky v gramoch.

▼B**7. Validácia výsledkov****7.1. Zhodnosť**

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého sa porovnávajú spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.9.3) obsahujúceho 6 µg/ml robenidínu.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.9.3). Množstvo pridaného robenidínu musí byť podobné odhadovanému množstvu robenidínu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku robenidínu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť približne v rozsahu $\pm 10\%$ pôvodnej šírky.

7.1.2. Detekcia detektorom diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa týchto kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorpcie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obvyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm;
- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v častiach spektra medzi 250 a 400 nm v rozsahu od 10 % až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorpcie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 250 a 400 nm v rozsahu 10 % až 100 % relatívnej absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak vo všetkých pozorovaných bodoch odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorpcie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, potom prítomnosť analytu nebola potvrdená.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 10 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah robenidínu, ktorý je vyšší ako 15 mg/kg.

7.3. Návratnosť

V prípade slepej vzorky doplnenej robenidínom musí byť návratnosť najmenej 85 %.

8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie

Zorganizovala sa medzilaboratórna štúdia ES, v rámci ktorej dvanásť laboratórií analyzovalo štyri vzorky krmiva pre hydinu a králiky, sypké alebo granulované. Každá vzorka sa analyzovala dvakrát. Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

▼ B

	Hydina		Králiky	
	sypké	granulované	sypké	granulované
priemer [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
Návratnosť [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %

S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %

F. STANOVENIE DIKLAZURILU

(+)-4-chlorofenyl[2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)fenyl]acetonitril.

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah diklazurilu v krmivách a v premixoch. Detekčný limit je 0,1 mg/kg, limit kvantifikácie je 0,5 mg/kg.

2. Podstata metódy

Po pridaní vnútorného štandardu sa vzorka extrahuje okysleným metanolom. Pri analýze krmív sa alikvotná časť extraktu prečistí na extrakčnej náplni s tuhou fázou C₁₈. Diklazuril sa vymyje z náplne zmesou okysleného metanolu a vody. Po odparení sa zvyšok rozpustí v zmesi DMF a vody. V prípade premixov sa extrakt odparí a zvyšok rozpustí v zmesi DMF a vody. Obsah diklazurilu sa stanoví ternárnym gradientom na reverznej fáze vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) použitím UV detektora.

3. Chemikálie

3.1. Voda, čistoty HPLC

3.2. Octan amónny

3.3. Tetrabutylamóniumhydrogénsulfát (TBHS)

3.4. Acetonitril, čistoty HPLC

3.5. Metanol, čistoty HPLC

3.6. N, N-dimetylformamid (DMF)

3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ₂₀ = 1,19 g/ml

3.8. Štandardná látka: diklazuril II-24: (+)-4-chlorofenyl[2,6-dichloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-yl)fenyl]acetonitril so zaručenou čistotou, E771.

3.8.1. Zásobný štandardný roztok diklazurilu, 500 µg/ml.

Navážte 25 mg štandardnej látky diklazurilu (3.8) s presnosťou na 0,1 mg do 50 ml odmernej banky. Rozpusťte v DMF (3.6), doplňte DMF po značku a premiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Pri teplote ≤ 4 °C je roztok stály 1 mesiac.

▼B

3.8.2. Štandardný roztok diklazurilu, 50 µg/ml.

Preneste 5,00 ml zásobného štandardného roztoku (3.8.1) do 50 ml odmernej banky, doplňte DMF (3.6) po značku a premiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.9. Vnútorý štandard: 2,6 dichloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5 dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H) – yl) α -metylbenzén-acetonitril

3.9.1. Zásobný roztok vnútorného štandardu, 500 µg/ml.

Navážte 25 mg vnútorného štandardu (3.9) s presnosťou na 0,1 mg do 50 ml odmernej banky. Rozpusťte v DMF (3.6), doplňte DMF po značku a premiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.9.2. Roztok vnútorného štandardu, 50 µg/ml.

Preneste 5,00 ml zásobného roztoku vnútorného štandardu (3.9.1) do 50 ml odmernej banky, doplňte DMF (3.6) po značku a premiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.9.3. Roztok vnútorného štandardu na premixy, p/1000 mg/ml

(p = nominálny obsah diklazurilu v premixe v mg/kg)

Navážte p/10 mg vnútorného štandardu s presnosťou na 0,1 mg do 100 ml odmernej banky, rozpusťte v DMF (3.6) v ultrazvukovom kúpeli (4.6), doplňte DMF po značku a zamiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite banku z hnedého skla a uložte do chladničky. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.10. Kalibračný roztok, 2 µg/ml.

Napipetujte 2,00 ml štandardného roztoku diklazurilu (3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnútorného štandardu (3.9.2) do 50 ml odmernej banky. Pridajte 16 ml DMF (3.6), doplňte DMF po značku a premiešajte. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvo pred použitím.

3.11. Extrakčná náplň C_{18} s tuhú fázou, napr. Bond Elute, veľkosť: 1 cc, hmotnosť sorbentu: 100 mg.

3.12. Extrakčný roztok: okyslený metanol.

Do 1 000 ml metanolu (3.5) napipetujte 5,0 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.7) a premiešajte.

3.13. Mobilná fáza pre HPLC

3.13.1. Eluent A: octan amónny – tetrabutylamóniumhydrogénsulfátu, roztok.

V 1 000 ml vody (3.1) rozpusťte 5 g octanu amónneho (3.2) a 3,4 g TBHS (3.3) a premiešajte.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (3.4).

3.13.3. Eluent C: metanol (3.5).

▼B**4. Prístrojové vybavenie**

- 4.1. Mechanická trepačka
- 4.2. HPLC prístroj na ternárny gradient
 - 4.2.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, s náplňou Hypersil ODS 3 μm , 100 mm $\times$ 4,6 mm, alebo ekvivalentná
 - 4.2.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo detektor diódového poľa
- 4.3. Filmová rotačná odparka
- 4.4. Membránový filter, 0,45 μm
- 4.5. Vákuové odparovacie zariadenie
- 4.6. Ultrazvukový kúpeľ

5. Postup**5.1. Všeobecné pokyny****5.1.1. Slepá vzorka**

Analyzujte slepú vzorku krmiva, aby ste overili, či neobsahuje ani diklazuril, ani interferujúce látky. Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a pri analýze sa nesmie dokázať prítomnosť diklazurilu alebo interferujúcej látky.

5.1.2. Test návratnosti

Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo diklazurilu, aké sa nachádza vo vzorke. S cieľom obohatiť na úroveň 1 mg/kg pridajte 0,1 ml zásobného štandardného roztoku (3.8.1) do 50 g slepej vzorky, dôkladne premiešajte, nechajte stáť 10 min. pred ďalším postupom (5.2) a ešte niekoľkokrát zamiešajte.

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorky (pozri bod 5.1.1), test návratnosti sa môže vykonať metódou prídavku štandardu. V tomto prípade sa vzorka, ktorá má byť analyzovaná, obohatí množstvom diklazurilu, ktoré je podobné množstvu už prítomnému vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a návratnosť sa vypočíta odčítaním.

5.2. Extrakcia**5.2.1. Krmivá**

Navážte približne 50 g vzorky s presnosťou na 0,01 g. Preneste do 500 ml kužeľovej banky, pridajte 1,00 ml roztoku vnútorného štandardu (3.9.2), 200 ml extrakčného činidla (3.12) a banku zazátkujte. Zmes nechajte cez noc v trepačke (4.1) pretrepať. Nechajte 10 minút usadiť. Preneste 20 ml alikvotnej časti supernatantu do vhodnej sklenenej nádoby a zriedte 20 ml vody. Preneste tento roztok na extrakčnú náplň (3.11) a nechajte pretiecť pomocou vákua (4.5). Premyte náplň 25 ml zmesi extrakčného činidla (3.12) a vody v pomere 65 + 35 (V + V). Vylejte zozbierané frakcie a vymyte zlúčeniny pomocou 25 ml zmesi extrakčného činidla (3.12) a vody v pomere 80 + 20 (V + V). Odparte túto frakciu dosucha na rotačnej odparke (4.3) pri teplote 60 °C. Zvyšok rozpustite v 1,0 ml DMF (3.6), pridajte 1,5 ml vody (3.1) a zamiešajte. Prefiltrujte cez membránový filter (4.4). Prejdite k ďalšiemu kroku, ktorým je stanovenie HPLC (5.3).

5.2.2. Premixy

Navážte približne 1 g vzorky s presnosťou na 0,001 g. Preneste do 500 ml kužeľovej banky, pridajte 1,00 ml roztoku vnútorného štandardu (3.9.3), 200 ml extrakčného činidla (3.12) a banku zazátkujte. Zmes nechajte cez noc pretrepať v trepačke (4.1). Nechajte 10 minút usadiť.

▼ B

Preneste alikvotnú časť 10 000/p ml (p = nominálny obsah diklazurilu v premixe v mg/kg) supernatantu do primerane veľkej banky s guľatým dnom. Odparte na vákuovej rotačnej odparke (4.3) dosucha pri 60 °C a zníženom tlaku. Znovu rozpustíte zvyšok v 10,0 ml DMF (3.6), pridajte 15,0 ml vody (3.1) a premiešajte. Prejdite k ďalšiemu kroku, ktorým je stanovenie pomocou HPLC (5.3).

5.3. *Stanovenie HPLC*5.3.1. *Parametre*

Odporúčané sú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov:

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, s náplňou Hypersil ODS 3 µm alebo ekvivalentná	
Mobilná fáza:	Eluent A (3.13.1):	Vodný roztok octanu amónneho a tetra- butyl-amónium hydro- génsulfátu
	Eluent B (3.13.2):	acetonitril
	Eluent C (3.13.3):	metanol
Elučný model:	— lineárny gradient — počiatočné podmienky A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — po 10 min gradientová elúcia počas 30 min na: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Vypláchnutie s B počas 10 min.	
Prietoková rýchlosť:	1,5 – 2 ml/min.	
Vstrekový objem:	20 µl	
Detekčná vlnová dĺžka:	280 nm	

Niekoľkonásobným nastreknutím kalibračného roztoku (3.10) obsahujúceho 2 µl/ml diklazurilu sa skontroluje stabilita chromatografického systému, až kým sa dosiahne konštantná výška píku a konštantné retenčné časy.

5.3.2. *Kalibračný roztok*

Niekoľkokrát sa nastrekne 20 µl kalibračného roztoku (3.10) a stanoví sa priemerná výška (plocha) píku diklazurilu a vnútorného štandardu.

5.3.3. *Roztok vzorky*

Niekoľkokrát sa nastrekne 20 µl roztoku vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) a stanoví sa priemerná výška (plocha) píku diklazurilu a vnútorného štandardu.

6. **Výpočet výsledkov**6.1. *Krmivá*

Obsah w diklazurilu (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

▼ B

kde:

$h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diklazurilu v roztoku vzorky (5.2.1),
 $h_{i,s}$ = výška (plocha) píku vnútorného štandardu v roztoku vzorky (5.2.1),
 $h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diklazurilu v kalibračnom roztoku (3.10),
 $h_{i,c}$ = výška (plocha) píku vnútorného štandardu v kalibračnom roztoku (3.10),
 $c_{d,c}$ = koncentrácia diklazurilu v kalibračnom roztoku v $\mu\text{g/ml}$ (3.10),
 m = hmotnosť navážky vzorky v g,
 V = objem extraktu vzorky podľa 5.2.1 (t. j. 2,5 ml).

6.2. Premixy

Obsah w diklazurilu (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02 \times V \times p}{m} [\text{mg/kg}]$$

kde:

$h_{d,c}$ = výška (plocha) píku diklazurilu v kalibračnom roztoku (3.10),
 $h_{i,c}$ = výška (plocha) píku vnútorného štandardu v kalibračnom roztoku (3.10),
 $h_{d,s}$ = výška (plocha) píku diklazurilu v roztoku vzorky (5.2.2),
 $h_{i,s}$ = výška (plocha) píku vnútorného štandardu v roztoku vzorky (5.2.2),
 $c_{d,c}$ = koncentrácia diklazurilu v kalibračnom roztoku v $\mu\text{g/ml}$ (3.10),
 m = hmotnosť navážky vzorky v g,
 V = objem extraktu vzorky podľa 5.2.2 (t. j. 25 ml),
 p = nominálny obsah diklazurilu v mg/kg v premixe.

7. Validácia výsledkov

7.1. Zhodnosť

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) a kalibračného roztoku (3.10).

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.10). Množstvo pridaného diklazurilu má byť podobné odhadovanému množstvu diklazurilu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku diklazurilu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť v rozmedzí $\pm 10\%$ pôvodnej šírky píku diklazurilu alebo píku vnútorného štandardu v extrakte vzorky, do ktorého nebol diklazuril dodatočne pridaný.

7.1.2. Detekcia detektorom diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa týchto kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorbie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obvyčajne pohybuje v rozsahu $\pm 2 \text{ nm}$;

▼B

- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v častiach spektra medzi 230 a 320 nm v rozsahu od 10 % až 100 % relatívnej absorbančie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá, a ak v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne odchýlka medzi dvomi spektrami 15 % absorbančie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 230 a 320 nm v rozsahu 10 % až 100 % relatívnej absorbančie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak vo všetkých pozorovaných bodoch odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorbančie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, potom prítomnosť analytu nebola potvrdená.

7.2. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

- 30 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah diklazurilu od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg pre obsah diklazurilu medzi 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,
- 15 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah diklazurilu, ktorý je vyšší ako 5 mg/kg.

7.3. *Návratnosť*

Pre vzorky s prídavkom diklazurilu (slepá vzorka) musí byť návratnosť najmenej 80 %.

8. **Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

Vykonala sa medzilaboratórna štúdia, v rámci ktorej 11 laboratórií analyzovalo 5 vzoriek. Vzorky pozostávali z dvoch premixov; jeden s organickou maticou (O 100) a druhý s anorganickou (A 100). Teoretický obsah diklazurilu bol 100 mg/kg. Tri zmesi krmív pre hydinu pochádzali od troch rôznych výrobcov (NL) (L1/Z1/K1). Teoretický obsah diklazurilu bol 1 mg/kg. Laboratóriá dostali pokyn analyzovať každú vzorku jeden, príp. dvakrát. (Viac informácií o tejto medzilaboratórnej štúdii je uvedených v *Úradnom vestníku AOAC International*, zväzok 77, č. 6, 1994, s. 1 359 – 1 361). Výsledky sa nachádzajú v nasledujúcej tabuľke.

	Vzorka 1 A 100	Vzorka 2 O 100	Vzorka 3 L1	Vzorka 4 Z1	Vzorka 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Priemer	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
Nominálny obsah (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých hodnôt

S_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti

▼ B

S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti

9. Poznámky

Odozva diklazurilu musí vykazovať linearitu v celom koncentračnom rozsahu merania.

G. STANOVENIE LASALOCIDU SODNÉHO

Sodná soľ polyéteru monokarboxylovej kyseliny produkovanej mikroorganizmom Streptomyces lasaliensis

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah lasalocidu sodného v krmivách a v premixoch. Detekčný limit je 5 mg/kg, limit kvantifikácie je 10 mg/kg.

2. Podstata metódy

Lasalocid sodný sa vyextrahuje zo vzorky do okysleného metanolu a stanoví sa na reverznej fáze vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) pomocou fluorescenčného detektora.

3. Chemikálie

3.1. Dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.2. Kyselina ortofosforečná, w (w/w) = 85 %

3.3. Roztok kyseliny ortofosforečnej c = 20 %

Zriedte 23,5 ml kyseliny ortofosforečnej (3.2) vodou na objem 100 ml.

3.4. 6-metyl-2-heptylamín (1,5-dimetylhexylamín), w (w/w) = 99 %

3.5. Metanol, čistoty HPLC

3.6. Kyselina chlorovodíková, hustota c = 1,19 g/ml

3.7. Fosfátový pufer, roztok c = 0,01 mol/l

Rozpustite 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) v 500 ml vody (3.11), pridajte 3,5 ml kyseliny ortofosforečnej (3.2) a 10,0 ml 6-metyl-2-heptylamínu (3.4). Upravte pH na 4,0 roztokom kyseliny ortofosforečnej (3.3) a zriedte vodou na objem 1 000 ml (3.11).

3.8. Okyslený metanol

Do 1 000 ml odmernej banky preneste 5,0 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.6), doplňte po značku metanolom (3.5) a premiešajte. Tento roztok sa musí pripravovať čerstvo pred použitím.

3.9. HPLC mobilná fáza, roztok fosfátového pufru a metanolu v pomere 5 + 95 (V + V)

Zmiešajte 5 ml roztoku fosfátového pufru (3.7) s 95 ml metanolu (3.5).

3.10. Štandardná látka lasalocid sodný so zaručenou čistotou, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sodná soľ polyéteru monokarboxylovej kyseliny produkovaná mikroorganizmom *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Štandardný zásobný roztok lasalocidu sodného, 500 g/ml

Navážte 50 mg lasalocidu sodného (3.10) s presnosťou na 0,1 mg do 100 ml odmernej banky, rozpustite v okyslenom metanole (3.8), doplňte po značku okysleným metanolom a premiešajte. Tento roztok sa musí pripravovať čerstvo pred použitím.

▼B**3.10.2. Pracovný štandardný roztok lasalocidu sodného, 50 µg/ml**

Do 100 ml odmernej banky napipetujte 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.10.1), doplňte okysleným metanolom po značku (3.8) a premiešajte. Tento roztok sa musí pripravovať čerstvo pred použitím.

3.10.3. Kalibračné roztoky

Do série 50 ml odmerných baniek preneste 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.10.2). Doplňte po značku okysleným metanolom (3.8) a premiešajte. Jednotlivé roztoky zodpovedajú 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 a 10,0 µg/ml lasalocidu sodného. Tieto roztoky sa musia pripravovať čerstvo pred použitím.

3.11. Voda, čistoty HPLC**4. Prístrojové vybavenie****4.1. Ultrazvukový kúpeľ (alebo vodný kúpeľ s trepaním) s regulátorom teploty****4.2. Membránové filtre, 0,45 µm****4.3. HPLC zariadenie so vstrekovacím systémom, vhodné na vstrekovanie objemov 20 µl.****4.3.1. Kvapalinová chromatografická kolóna 125 mm × 4 mm, reverzná fáza s náplňou C₁₈, 5 µm alebo ekvivalentná****4.3.2. Spektrofluorimeter s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou excitácie a emisie vlnových dĺžok****5. Postup****5.1. Všeobecné pokyny****5.1.1. Slepá vzorka**

Na kontrolu neprítomnosti lasalocidu sodného a interferujúcich látok sa analyzuje slepá vzorka krmiva pre test návratnosti (5.1.2). Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a pri analýze sa nesmie dokázať prítomnosť lasalocidu sodného alebo interferujúcich látok.

5.1.2. Test návratnosti

Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo lasalocidu sodného, aké sa nachádza vo vzorke. K doplneniu na úroveň 100 mg/kg lasalocidu sodného preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.10.1) do 250 ml kužeľovej banky a nechajte roztok odpariť na objem približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepej vzorky, dôkladne premiešajte a nechajte 10 minút pred uskutočnením extrakcie (5.2) stáť za občasného premiešania.

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorky (pozri bod 5.1.1), test návratnosti sa môže vykonať metódou pridávania štandardu. V tomto prípade sa vzorka, ktorá má byť analyzovaná, obohatí množstvom lasalocidu sodného, ktoré je podobné množstvu prítomnému vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a návratnosť sa vypočíta odčítaním.

5.2. Extrakcia**5.2.1. Krmivo**

Navážte 5 g až 10 g vzorky s presnosťou na 0,01 g do 250 ml kužeľovej banky s uzáverom. Pipetou pridajte 100,0 ml okysleného metanolu (3.8). Voľne uzavrite a krúživým pohybom jej obsah premiešajte. Umiestnite banku na 20 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.1) pri

▼ B

približne 40 °C, potom ju vyberte a ochlad'ite na laboratórnu teplotu. Nechajte odstáť približne 1 hodinu, kým sa suspendovaná látka neusadí, a potom alikvotnú časť prefiltrujte cez 0,45 µm membránový filter (4.2) do vhodnej nádoby. Prejdite k ďalšiemu kroku, ktorým je stanovenie pomocou HPLC (5.3).

5.2.2. Premixy

Navážte s presnosťou na 0,001 g približne 2 g nepomletého premixu do 250 ml odmernej banky. Pipetou pridajte 100,0 ml okysleného metanolu (3.8) a krúživým pohybom premiešajte. Umiestnite banku s jej obsahom na 20 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.1) pri približne 40 °C, potom ju vyberte a ochlad'ite na laboratórnu teplotu. Dopln'ite po značku okysleným metanolom (3.8) a dôkladne premiešajte. Nechajte 1 hodinu odstáť, kým sa suspendovaná látka neusadí, a potom alikvotnú časť prefiltrujte cez 0,45 µm membránový filter (4.2). Rozried'ite primeraný objem číreho filtrátu okysleným metanolom (3.8), čím získate konečný skúšobný roztok, ktorý obsahuje približne 4 µg/ml lasalocidu sodného. Prejdite k ďalšiemu kroku, ktorým je stanovenie pomocou HPLC (5.3).

5.3. Stanovenie HPLC**5.3.1. Parametre**

Odporúčané sú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu použiť, ak zabezpečia dosiahnutie ekvivalentných výsledkov:

Kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.3.1):	125 mm × 4 mm, reverzná fáza s náplňou C ₁₈ , 5 µm alebo ekvivalentná
Mobilná fáza (3.9):	zmes roztoku fosfátového pufru (3.7) a metanolu (3.5), v pomere 5 + 95 (V + V)
Prietoková rýchlosť:	1,2 ml/min.
Detekčná vlnová dĺžka:	
Excitácia:	310 nm
Emisia:	419 nm
Vstrekový objem:	20 µl

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.10.3) obsahujúci 4,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky (alebo plochy) píkovej a konštantné retenčné časy.

5.3.2. Kalibračný graf

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.10.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkovej pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračný graf, pričom použite priemerné výšky (plochy) píkovej ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

5.3.3. Roztok vzorky

Nastreknite extrakty vzoriek získané podľa 5.2.1 alebo 5.2.2 niekoľkokrát, použitím rovnakého objemu, ako bol odobratý pre kalibračný roztok, a stanovte priemerné výšky (plochy) píkovej pre hodnoty píkovej lasalocidu sodného.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku získanej nastreknutím roztoku vzorky (5.3.3) stanovte koncentráciu lasalocidu sodného (µg/ml) porovnaním s kalibračným grafom.

▼ B**6.1. Krmivá**

Obsah w lasalocidu sodného (mg/kg) vzorky sa vypočíta podľa tohto vzorca:

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

kde:

c = koncentrácia lasalocidu sodného v roztoku vzorky (5.2.1) v µg/ml,
V₁ = objem extraktu vzorky podľa 5.2.1 v ml (t. j. 100),
m = hmotnosť navážky vzorky v g.

6.2. Premixy

Obsah w lasalocidu sodného (mg/kg) sa vypočíta podľa tohto vzorca:

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

kde:

c = koncentrácia lasalocidu sodného v roztoku vzorky (5.2.2) v µg/ml,
V₂ = objem extraktu vzorky podľa 5.2.2 v ml (t. j. 250),
f = faktor zriedenia podľa 5.2.2,
m = hmotnosť navážky vzorky v g.

7. Validácia výsledkov**7.1. Zhodnosť**

Metódy založené na spektrofotometrii podliehajú interferencii v menšej miere ako metódy, pri ktorých sa používa UV detekcia. Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky (5.2.1 alebo 5.2.2) sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.10.3). Množstvo pridaného lasalocidu sodného musí byť podobné množstvu lasalocidu sodného, zistenému v extrakte vzorky. Iba výška píku lasalocidu sodného sa má zvýšiť v závislosti od množstva pridaného lasalocidu sodného a od zriedenia extraktu. Šírka píku v polovičnej výške musí byť v rozsahu ± 10 % pôvodnej šírky píku vytvorenej neobohateným extraktom vzorky.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

- 15 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah lasalocidu sodného od 30 mg/kg do 100 mg/kg,
- 15 mg/kg pre obsah lasalocidu sodného od 100 mg/kg do 200 mg/kg,
- 7,5 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah lasalocidu sodného nad 200 mg/kg.

7.3. Návratnosť

V prípade obohatenej (slepej) vzorky krmiva má byť návratnosť najmenej 80 %. V prípade obohatenej vzorky premixu má byť návratnosť najmenej 90 %.

▼B**8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

Vykonala sa medzilaboratórna štúdia (*), v rámci ktorej 12 laboratórií analyzovalo 2 premixy (vzorky 1 a 2) a 5 krmív (vzorky 3 – 7). Každá vzorka sa analyzovala dvakrát. Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke:

	Vzorka 1 Premixy pre kurčatá	Vzorka 2 Premixy pre morky	Vzorka 3 Granule pre morky	Vzorka 4 Granulo- vané krmivo pre kurčatá	Vzorka 5 Krmivo pre morky	Vzorka 6 Krmivo pre hydinu A	Vzorka 7 Krmivo pre hydinu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
priemer [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
Nominálny obsah [mg/kg]	5 000 (- *)	16 000 (- *)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Obsah deklarovaný výrobcom.

(**) Krmivo pripravené v laboratóriu.

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých výsledkov

s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

s_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %



PRÍLOHA V

METÓDY ANALÝZY NA KONTROLU NEŽIADUCICH LÁTOK
V KRMIVÁCH

A. STANOVENIE VOĽNÉHO A CELKOVÉHO GOSYPOLU

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah voľného gosypolu, celkového gosypolu a chemicky príbuzných látok v bavlníkovom semene, v bavlníkovom extrahovanom šrote a v bavlníkových výliskoch a v kŕmnych zmesiach obsahujúcich tieto kŕmne suroviny, v množstvách väčších ako 20 mg/kg.

2. Podstata metódy

Gosypol sa extrahuje v prítomnosti 3-aminopropanolu buď zmesou 2-propanolu a hexánu, ak ide o stanovovanie voľného gosypolu, alebo dimetylformamidom, ak ide o stanovovanie celkového gosypolu. Gosypol sa prevedie anilínom na gosypol-dianilín, ktorého absorbanca sa zmeria pri 440 nm.

3. Chemikálie

3.1. Zmes 2-propanolu a hexánu: zmiešajte 60 objemových dielov 2-propanolu so 40 objemovými dielmi *n*-hexánu.

3.2. Činidlo A: vložte do 1 litrovej odmernej banky približne 500 ml zmesi 2-propanolu a hexánu (3.1), 2 ml 3-aminopropanolu, 8 ml ľadovej kyseliny octovej a 50 ml vody. Doplňte na objem 1 l zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Toto činidlo je stabilné jeden týždeň.

3.3. Činidlo B: napipetujte 2 ml 3-aminopropanolu a 10 ml ľadovej kyseliny octovej do 100 ml odmernej banky. Ochlaďte na laboratórnu teplotu a doplňte objem N, N-dimetylformamidom. Toto činidlo je stabilné jeden týždeň.

3.4. Anilín: *ak optická hustota pri slepom pokuse presiahne hodnotu 0,022*, anilín predestilujte nad práškovým zinkom, pričom prvých a posledných 10 % frakcie destilátu odstráňte. V chladničke a v banke z hnedého skla so zábrusovou zátkou sa toto činidlo uchováva niekoľko mesiacov.

3.5. Štandardný roztok gosypolu A: vložte 27,9 mg octanu gosypolu do 250 ml odmernej banky. Rozpusťte a na objem doplňte činidlom A (3.2). Napipetujte 50 ml tohto roztoku do 250 ml odmernej banky a doplňte na objem činidlom A. Koncentrácia gosypolu v tomto roztoku je 0,02 mg/ml. Pred použitím nechajte stáť jednu hodinu pri laboratórnej teplote.

3.6. Štandardný roztok gosypolu B: vložte 27,9 mg octanu gosypolu do 50 ml odmernej banky. Rozpusťte a na objem doplňte činidlom B (3.3). Koncentrácia gosypolu v tomto roztoku je 0,5 mg/ml.

Štandardné roztoky gosypolu A a B sú stále 24 hodín, ak sú chránené pred svetlom.

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Mixér (trepačka): približne 35 ot/min.

▼ B

4.2. Spektrofotometer.

5. **Postup**

5.1. *Skúšobná vzorka*

Množstvo použitej skúšobnej vzorky závisí od predpokladaného obsahu gosypolu vo vzorke. Je výhodnejšie pracovať s malou skúšobnou vzorkou a s relatívne veľkým alikvotným podielom filtrátu, aby sa získalo dostatočné množstvo gosypolu na presné fotometrické meranie. Na *stanovenie voľného gosypolu* v bavlníkovom semene, bavlníkovom extrahovanom šrote a v bavlníkových výliskoch nesme množstvo skúšobnej vzorky presiahnuť 1 g; pri kŕmnych zmesiach to môže byť až 5 g. Väčšinou je vhodná alikvotná časť filtrátu 10 ml; ktorá má obsahovať 50 až 100 µg gosypolu. Na *stanovenie celkového gosypolu* má byť množstvo skúšobnej vzorky medzi 0,5 a 5 g tak, aby alikvotná časť filtrátu 2 ml obsahovala 40 až 200 µg gosypolu.

Analýza sa musí vykonávať pri laboratórnej teplote okolo 20 °C.

5.2. *Stanovenie voľného gosypolu*

Vložte skúšobnú vzorku do 250 ml banky so zábrusovým hrdlom, na dno banky vložte drvené sklo. Pipetou pridajte 50 ml činidla A (3.2), banku zazátkujte a miešajte jednu hodinu v miešači. Prefiltrujte cez suchý filter a filtrát zachyťte v malej banke so zábrusovým hrdlom. Počas filtrácie lievik prikryte hodinovým sklíčkom.

Napipetujte rovnaké alikvotné časti filtrátu obsahujúce 50 až 100 µg gosypolu do dvoch 25 ml odmerných baniek (A a B). V prípade potreby doplňte objem na 10 ml činidlom A (3.2). Potom obsah banky (A) doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tento roztok sa použije ako referenčný roztok proti roztoku vzorky pri meraní.

Napipetujte 10 ml činidla A (3.2) do dvoch ďalších 25 ml odmerných baniek (C a D). Objem banky (C) doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tento roztok sa použije ako referenčný roztok proti slepému pokusu pri meraní.

Do každej banky (D) a (B) pridajte 2 ml anilínu (3.4). Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochlaďte na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu.

Stanovte optickú hustotu slepého roztoku (D) porovnaním s referenčným roztokom (C) a optickú hustotu roztoku vzorky (B) porovnaním s porovnávacím roztokom (A) na spektrofotometri pri 440 nm v sklenených kvetkách s hrúbkou 1 cm.

Odpočítajte optickú hustotu roztoku pri slepom pokuse od optickej hustoty roztoku vzorky (= korigovaná optická hustota). Z tejto hodnoty vypočítajte obsah voľného gosypolu, ako je uvedené v bode 6.

5.3. *Stanovenie celkového gosypolu*

Vložte skúšobnú vzorku obsahujúcu 1 až 5 mg gosypolu do 50 ml odmernej banky a pridajte 10 ml činidla B (3.3). Zároveň pripravte slepý pokus tak, že vložíte 10 ml činidla B (3.3) do ďalšej 50 ml odmernej banky. Obidve banky zahrievajte 30 minút nad vriacim

▼ B

vodným kúpeľom. Ochladte na laboratórnu teplotu a obsah každej banky doplňte na objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Premiešajte a nechajte na 10 až 15 minút usadiť, potom prefiltrujte a zachyťte filtráty do baniek so zábrusovým hrdlom.

Napipetujte 2 ml filtrátu vzorky do dvoch 25 ml odmerných baniek a 2 ml filtrátu slepého pokusu do dvoch ďalších 25 ml baniek. Obsah jednej banky z každej série doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1). Tieto roztoky sa použijú ako referenčné roztoky.

Do každej z ďalších dvoch baniek pridajte 2 ml anilínu (3.4). Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochladte na laboratórnu teplotu, doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu.

Stanovte optickú hustotu, ako je uvedené v bode 5.2 pre voľný gosypol. Z tejto hodnoty vypočítajte obsah celkového gosypolu, ako je uvedené v bode 6.

6. Výpočet výsledkov

Výsledky možno vypočítať buď zo špecifickej optickej hustoty (6.1) alebo podľa kalibračnej krivky (6.2).

6.1. Výpočet zo špecifickej optickej hustoty

Hodnoty špecifickej optickej hustoty sú, za opísaných podmienok, takéto:

$$\text{Voľný gosypol: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Celkový gosypol: } E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

Obsah voľného gosypolu vo vzorke sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% \text{ gosypolu} : \frac{E \times 1\,250}{E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times p \times a}$$

kde:

E = korigovaná optická hustota, stanovená podľa bodu 5.2,

p = skúšobná vzorka v g,

a = alikvotná časť filtrátu v ml.

6.2. Výpočet z kalibračnej krivky

6.2.1. Voľný gosypol:

Pripravte dve série piatich 25 ml baniek. Napipetujte alikvotne časti 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml štandardného roztoku gosypolu A (3.5) do každej série baniek. Doplňte na objem 10 ml činidlom A (3.2). Každú sériu doplňte jednou 25 ml odmernou bankou obsahujúcou len 10 ml činidla A (3.2) (slepý pokus).

Doplňte objem v prvej sérii baniek (vrátane banky na slepý pokus) na 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1) (referenčná séria).

▼B

Pridajte 2 ml anilínu (3.4) do každej banky v druhej sérii (vrátane banky určenej na slepý pokus). Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom tak, aby sa vytvorila farba. Ochlaďte na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu (štandardná séria).

Stanovte optickú hustotu roztokov podľa bodu 5.2 v štandardnej sérii porovnaním so zodpovedajúcimi roztokmi v referenčnej sérii. Zostrojte kalibračnú krivku vynesением optických hustôt oproti zodpovedajúcim množstvám gosypolu (v µg).

6.2.2. Celkový gosypol:

Pripravte šesť 50 ml odmerných baniek. Do prvej banky dajte 10 ml roztoku B (3.3) a do ostatných 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml štandardného roztoku gosypolu B (3.6). Objem každej banky doplňte roztokom B (3.3) na 10 ml. Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom. Ochlaďte na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1) a premiešajte.

Napipetujte po 2,0 ml týchto roztokov do každej banky z dvoch sérií po šiestich 25 ml odmerných baniek. Obsah baniek z prvej série doplňte na objem 25 ml zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1) (referenčná séria).

Do každej banky druhej série pridajte 2 ml anilínu (3.4). Zahrievajte 30 minút nad vriacim vodným kúpeľom. Ochlaďte na laboratórnu teplotu, doplňte objem zmesou 2-propanolu a hexánu (3.1), premiešajte a nechajte stáť jednu hodinu (štandardná séria).

Stanovte optickú hustotu roztokov podľa bodu 5.2 v štandardnej sérii porovnaním so zodpovedajúcimi roztokmi v referenčnej sérii. Zostrojte kalibračnú krivku vynesением optických hustôt oproti zodpovedajúcim množstvám gosypolu (v µg).

6.3. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

— 15 % relatívnych z vyššej hodnoty pri obsahu gosypolu nižšom ako 500 ppm,

— 75 ppm v absolútnej hodnote pre obsah najmenej 500 ppm a najviac 750 ppm,

— 10 % relatívnych z vyššej hodnoty pri obsahu vyššom ako 750 ppm.

▼ M6

B. STANOVENIE OBSAHU DIOXÍNOV (PCDD/PCDF) A PCB

KAPITOLA I

Metódy odberu vzoriek a interpretácia analytických výsledkov

1. Rozsah pôsobnosti a vymedzenie pojmov

Vzorky určené na úradnú kontrolu obsahu polychlóvaných dibenzo-p-dioxínov (PCDD), polychlóvaných dibenzofuránov (PCDF) a dioxínom podobných polychlóvaných bifenylov (PCB) ⁽¹⁾ a dioxínom nepodobných PCB v krmivách sa odoberajú v súlade s ustanoveniami v prílohe I. V súvislosti s kontrolou látok alebo produktov homogénne rozložených v krmive sa musia uplatniť kvantitatívne požiadavky podľa bodu 5.1 prílohy I. Súhrnné vzorky, ktoré sa takto získajú, sa považujú za reprezentatívne pre šarže alebo podšarže, z ktorých sa odoberú. Dodržanie najvyšších prípustných obsahov stanovených smernicou 2002/32/ES sa zisťuje na základe obsahov stanovených v laboratórnych vzorkách.

Na účely tejto časti B sa uplatňuje vymedzenie pojmov stanovené v prílohe I k rozhodnutiu Komisie 2002/657/ES ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Tabuľka TEF (= faktorov toxikologickej ekvivalencie) pre PCDD, PCDF a dioxínom podobné PCB: Tabuľka WHO-TEF na posudzovanie rizika pre ľudí na základe záverov zo stretnutia odborníkov týkajúceho sa medzinárodného programu chemickej bezpečnosti (IPCS) Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), ktorý sa konal v Ženeve v júni 2005 [Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)].

Kongenér	Hodnota TEF	Kongenér	Hodnota TEF
dibenzo-p-dioxíny („PCDD“) a dibenzo-p-furány („PCDF“)		„dioxínom podobné“ PCB non-orto PCB + mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Použité skratky: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hexa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = chlórdibenzodioxín; „CDF“ = chlórdibenzofurán; „CB“ = chlórifenyl.

⁽²⁾ Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES zo 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov (Ú. v. ES L 221, 17.8.2002, s. 8).

▼ **M6**

Okrem uvedeného vymedzenia pojmov sa na účely tejto časti B uplatňuje toto vymedzenie pojmov:

„Skriningové metódy“ sú metódy používané na výber vzoriek s obsahmi PCDD/F a dioxínom podobných PCB, ktoré prekračujú najvyššie prípustné obsahy alebo akčné prahové hodnoty. Tieto metódy umožňujú analyzovať vysoký počet vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť zistenia nových prípadov vysokej expozície a zdravotných rizík pre spotrebiteľov. Skriningové metódy sú založené na bioanalytických metódach alebo metódach GC-MS. Výsledky vzoriek prekračujúcich medznú hodnotu používanú na kontrolu súladu s najvyšším prípustným obsahom sa overujú úplnou opätovnou analýzou pôvodnej vzorky pomocou potvrdzujúcej metódy.

„Potvrdzujúce metódy“ sú metódy, ktoré poskytujú úplné alebo doplnujúce informácie, na základe ktorých možno jednoznačne určiť a kvantifikovať PCDD/F a dioxínom podobné PCB na úrovni najvyššieho prípustného obsahu alebo, v prípade potreby, akčnej prahovej hodnoty. Pri týchto metódach sa využíva plynová chromatografia/hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (GC-HRMS) alebo plynová chromatografia/tandemová hmotnostná spektrometria (GC-MS/MS).

2. Súlad šarže alebo podšarže s najvyšším prípustným obsahom

2.1. Pokiaľ ide o dioxínom nepodobné PCB

Šarža alebo podšarža sú v súlade s najvyšším prípustným obsahom, ak analytický výsledok sumy PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180 (ďalej len „dioxínom nepodobné PCB“) nepresahuje najvyšší prípustný obsah stanovený v smernici 2002/32/ES, berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania⁽¹⁾. Šarža alebo podšarža nie sú v súlade s najvyšším prípustným obsahom stanoveným smernicou 2002/32/ES, ak stredná hodnota dvoch horných medzí⁽²⁾ analytických výsledkov získaných na základe dvojnásobnej analýzy⁽³⁾, berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania, bez odôvodnených pochybností presahuje najvyšší prípustný obsah, t. j. na posúdenie súladu sa používa analyzovaná koncentrácia po odpočítaní rozšírenej neistoty merania.

Rozšírená neistota merania sa vypočíta s použitím koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie sú v súlade, ak stredná hodnota nameraných hodnôt mínus rozšírená neistota strednej hodnoty presahuje najvyšší prípustný obsah.

⁽¹⁾ V príslušnom prípade treba dodržiavať zásady opísané v dokumente *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ Koncepcia „hornej medze“ si vyžaduje použitie kvantifikačného limitu pre podiel každého nekvantifikovaného kongenéra. Koncepcia „dolnej medze“ si vyžaduje použitie nulovej hodnoty pre podiel každého nekvantifikovaného kongenéra. Koncepcia „strednej medze“ si vyžaduje použitie polovice kvantifikačného limitu pri výpočte podielu každého nekvantifikovaného kongenéra.

⁽³⁾ Dvojnásobná analýza: samostatná analýza skúmaných analytov s použitím druhej alikvotnej časti tej istej homogenizovanej vzorky. Vo všeobecnosti platia požiadavky týkajúce sa dvojnásobnej analýzy stanovené v kapitole C bode 3 prílohy II. V prípade metód s použitím vnútorných štandardov označených izotopom ¹³C pre príslušné analyty je však potrebná dvojnásobná analýza, iba ak výsledok prvého stanovenia nie je vyhovujúci. Dvojnásobná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek. V prípade, že sa analýza vykonáva v súvislosti s kontamináciou, môže sa potvrdzovanie dvojnásobnou analýzou vynechať, ak sú vzorky vybrané na analýzu výsledovateľné k danému prípadu kontaminácie a zistený obsah významne prekračuje najvyšší prípustný obsah.

▼ **M6**

Pravidlá uvedené v už uvedených odsekoch tohto bodu sa uplatňujú na výsledok analýzy získaný v prípade vzorky určenej na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú pravidlá členského štátu.

2.2. *Pokiaľ ide o PCDD/F a dioxínom podobné PCB*

Šarža alebo podšarža sú v súlade s najvyšším prípustným obsahom, ak výsledok jednej analýzy

- vykonanej skriningovou metódou, ktorá má mieru výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad nižšiu ako 5 %, indikuje, že sa neprekročila úroveň príslušného najvyššieho prípustného obsahu PCDD/F a sumy PCDD/F a dioxínom podobných PCB podľa smernice 2002/32/ES,
- vykonanej potvrdzujúcou metódou nepresahuje príslušný najvyšší prípustný obsah PCDD/F a sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB stanovené v smernici 2002/32/ES, s ohľadom na rozšírenú neistotu merania.

V prípade skriningových testov sa stanovuje medzná hodnota pre rozhodnutia o súlade vzorky s príslušnými najvyššími prípustnými obsahmi stanovenými buď pre PCDD/F, alebo pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB.

Šarža alebo podšarža nie sú v súlade s najvyšším prípustným obsahom stanoveným smernicou 2002/32/ES, ak stredná hodnota dvoch horných medzi⁽¹⁾ analytických výsledkov získaných na základe dvojnásobnej analýzy⁽²⁾ pomocou potvrdzujúcej metódy, berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania, bez odôvodnených pochybností presahuje najvyšší prípustný obsah, t. j. na posúdenie súladu sa používa analyzovaná koncentrácia po odpočítaní rozšírenej neistoty merania.

Rozšírená neistota merania sa vypočíta s použitím koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % úroveň spoľahlivosti. Šarža alebo podšarža nie sú v súlade, ak stredná hodnota nameraných hodnôt mínus rozšírená neistota strednej hodnoty presahuje najvyšší prípustný obsah.

Pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa použije suma odhadovaných rozšírených neistôt samostatných analytických výsledkov týkajúcich sa PCDD/F a dioxínom podobných PCB.

Pravidlá uvedené vo vyššie uvedených odsekoch tohto bodu sa uplatňujú na výsledok analýzy získaný v prípade vzorky určenej na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obhajoby alebo na referenčné účely sa uplatňujú pravidlá členského štátu.

⁽¹⁾ Koncepcia „hornej medze“ si vyžaduje použitie kvantifikačného limitu pre podiel každého nekvantifikovaného kongenera na toxickom ekvivalente (TEQ). Koncepcia „dolnej medze“ si vyžaduje použitie nulovej hodnoty pre podiel každého nekvantifikovaného kongenera na TEQ. Koncepcia „strednej medze“ si vyžaduje použitie polovice kvantifikačného limitu pri výpočte podielu každého nekvantifikovaného kongenera na TEQ.

⁽²⁾ Vo všeobecnosti platia požiadavky týkajúce sa dvojnásobnej analýzy stanovené v kapitole C bode 2 prílohy II. V prípade potvrdzujúcich metód s použitím vnútorných štandardov označených izotopom ¹³C pre príslušné analyty je však potrebná dvojnásobná analýza, iba ak výsledok prvého stanovenia nie je vyhovujúci. Dvojnásobná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek. V prípade, že sa analýza vykonáva v súvislosti s kontamináciou, môže sa potvrdzovanie dvojnásobnou analýzou vynechať, ak sú vzorky vybrané na analýzu výsledovateľné k danému prípadu kontaminácie a zistený obsah významne prekračuje najvyšší prípustný obsah.

▼ **M6****3. Výsledky presahujúce akčné prahové hodnoty stanovené v prílohe II k smernici 2002/32/ES**

Akčné prahové hodnoty slúžia ako nástroj na výber vzoriek v prípadoch, keď treba zistiť zdroj kontaminácie a prijať opatrenia na jej zníženie alebo eliminovanie. Pomocou skríningových metód sa stanovujú vhodné medzné hodnoty na výber uvedených vzoriek. Ak je potrebné vyvinúť značné úsilie na zistenie zdroja a zníženie alebo elimináciu kontaminácie, je vhodné potvrdiť prekročenie akčnej prahovej hodnoty dvojnásobnou analýzou použitím potvrdzujúcej metódy zohľadňujúcej rozšírenú neistotu merania ⁽¹⁾.

*KAPITOLA II****Príprava vzoriek a požiadavky na metódy analýzy, ktoré sa používajú pri úradnej kontrole obsahu dioxínov (PCDD/F) a dioxínom podobných PCB v krmivách*****1. Oblasť použitia**

Požiadavky, ktoré sú stanovené v tejto kapitole, sa uplatňujú v prípadoch, keď sa vykonáva analýza krmív na úradnú kontrolu obsahu 2,3,7,8-substituovaných PCDD/F a dioxínom podobných PCB, a pokiaľ ide o prípravu vzoriek a analytické požiadavky na iné regulačné účely vrátane kontrol, ktoré vykonávajú prevádzkovatelia krmivárskych podnikov s cieľom zabezpečiť súlad s ustanoveniami nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ⁽²⁾.

Monitorovanie prítomnosti PCDD/F a dioxínom podobných PCB v krmive sa môže vykonávať pomocou dvoch rozličných druhov analytických metód:

a) Skríningové metódy

Cieľom skríningových metód je výber tých vzoriek, v ktorých obsah PCDD/F a dioxínom podobných PCB prekračuje najvyššie prípustné obsahy alebo akčné prahové hodnoty. Skríningové metódy zabezpečujú analýzu vysokého počtu vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, a zvyšujú tak pravdepodobnosť zistenia nových prípadov vysokej expozície a zdravotných rizík pre spotrebiteľov. Ich použitie slúži na predchádzanie výsledkom vykazujúcim falošný súlad. Môžu zahŕňať bioanalytické metódy a metódy GC-MS.

Skríningovými metódami sa porovnáva analytický výsledok s medznou hodnotou, na základe čoho sa určuje možné prekročenie/neprekročenie najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty. Koncentrácia PCDD/F a suma PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách, pri ktorých existuje podozrenie, že nie sú v súlade s najvyšším prípustným obsahom, sa musí stanoviť alebo potvrdiť potvrdzujúcou metódou.

Skríningové metódy môžu navyše poskytnúť informáciu o hladinách PCDD/F a dioxínom podobných PCB prítomných vo vzorke. V prípade uplatňovania bioanalytických skríningových metód sa výsledok vyjadruje v bioanalytických ekvivalentoch (BEQ), zatiaľ čo v prípade uplatňovania fyzikálno-chemických metód GC-MS sa vyjadruje v toxických ekvivalentoch (TEQ). Číselné výsledky skríningových metód sú vhodné na preukázanie súladu, podozrenia na

⁽¹⁾ To isté vysvetlenie a tie isté požiadavky týkajúce sa dvojnásobnej analýzy na kontrolu akčných prahových hodnôt, ako sa uvádzajú v poznámke pod čiarou č. 2 týkajúcej sa najvyšších prípustných obsahov.

⁽²⁾ Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 z 12. januára 2005, ktorým sa stanovujú požiadavky na hygienu krmív (Ú. v. EÚ L 35, 8.2.2005, s. 1).

▼ M6

nesúladi alebo prekročení akčných prahových hodnôt a poskytujú informáciu o rozsahu obsahu v prípade následného použitia potvrdzujúcich metód. Nie sú vhodné na hodnotenie obsahu pozadia, odhad príjmu, sledovanie dlhodobého trendu obsahov ani na prehodnotenie akčných prahových hodnôt a najvyšších prípustných obsahov.

b) *Potvrdzujúce metódy*

Potvrdzujúce metódy umožňujú jednoznačnú identifikáciu a kvantifikáciu PCDD/F a dioxínom podobných PCB prítomných vo vzorke a poskytujú úplné informácie o jednotlivých kongenéroch. Preto uvedené metódy umožňujú kontrolu najvyšších prípustných obsahov a akčných prahových hodnôt vrátane potvrdenia výsledkov získaných skríningovými metódami. Okrem toho sa výsledky môžu použiť na iné účely, ako napríklad na stanovenie nízkych obsahov pozadia pri monitorovaní krmív, sledovanie dlhodobého trendu obsahov, posúdenie expozície obyvateľstva a vytváranie databázy na účely možného prehodnotenia akčných prahových hodnôt a najvyšších prípustných obsahov. Takisto sú dôležité z dôvodu stanovenia kongenérovaných profilov na účely identifikácie zdroja novej kontaminácie. Pri týchto metódach sa používa GC-HRMS. Na potvrdenie súladu alebo nesúladu s najvyšším prípustným obsahom sa môže použiť aj metóda GC-MS/MS.

2. **Súvislosti**

Pri výpočte koncentrácií TEQ sa vynásobia koncentrácie jednotlivých látok v predmetnej vzorke príslušným faktorom toxikologickej ekvivalencie (TEF) (pozri poznámku pod čiarou č. 1 v kapitole I) a následne sa spočítavajú, aby sa dospelo k celkovej koncentrácii dioxínom podobných zlúčenín, vyjadrenej v TEQ.

Na účely tejto časti B je akceptovaným špecifickým kvantifikačným limitom jednotlivého kongeneru najnižší obsah analytu, ktorý je možné merať s primeranou štatistickou istotou a ktorý spĺňa identifikačné kritériá opísané v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC-HRMS a indikátorových PCB metódou GC-HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien.

Kvantifikačný limit jednotlivého kongeneru sa môže identifikovať ako:

- a) koncentrácia analytu v extrakte vzorky, ktorá sa prejaví takou odozvou dvoch sledovaných rozličných iónov, pre ktorú platí pomer S/N (signál/šum) 3:1 pre signál menej intenzívneho iónu; alebo
- b) ak z technických príčin výpočet pomeru signál/šum neposkytuje spoľahlivé výsledky, najnižší koncentračný bod na kalibračnej krivke, ktorá poskytuje prijateľnú ($\leq 30\%$) a konzistentnú odchýlku (meranú aspoň na začiatku a konci analytickej série vzoriek) od priemerného relatívneho odozového faktora vypočítaného pre všetky body kalibračnej krivky v každej sérii vzoriek. Kvantifikačný limit (LOQ) sa vypočíta z najnižšieho koncentračného bodu použitím výťažnosti vnútorných štandardov a množstva vzorky.

▼ **M6**

Bioanalytické skríningové metódy neposkytujú výsledky na úrovni kongenér, ale iba orientačné hodnoty ⁽¹⁾ TEQ, vyjadrené v BEQ, s prihliadnutím na skutočnosť, že nie všetky zložky prítomné v extrakte vzorky vykazujúcom pozitívny výsledok v teste spĺňajú alebo dodržiavajú všetky požiadavky princípu TEQ.

Skríningové a potvrdzujúce metódy sa môžu použiť iba na kontrolu určitej matrice, ak príslušné metódy sú dostatočne citlivé na to, aby bola detekcia akčnej prahovej hodnoty alebo najvyššieho prípustného obsahu spofahlivá.

3. Požiadavky na zabezpečenie kvality

- 3.1. Prijmú sa opatrenia, ktoré zabránia krížovej kontaminácii na každom stupni odberu vzoriek a procesov analýzy.
- 3.2. Vzorky sa skladujú a prepravujú v sklenených, hliníkových, polypropylénových alebo polyetylénových nádobách vhodných na skladovanie, ktoré nemajú žiadny vplyv na obsah PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách. Z nádoby so vzorkami sa odstraňujú stopy po papierovom prachu.
- 3.3. Úschova a preprava vzorky sa vykonáva spôsobom, ktorý zabezpečí uchovanie integrity vzorky krmiva.
- 3.4. V prípade potreby sa každá laboratórna vzorka jemne zomelie a dôkladne premieša postupom, ktorý sa osvedčil na dosiahnutie dokonalej homogenizácie (napríklad vzorka sa zomelie tak, aby prešla okami sita s veľkosťou 1 mm). Ak je obsah vlhkosti vo vzorkách príliš vysoký, pred zomletím sa vysušia.
- 3.5. Vykonajú sa kontroly možného vplyvu reagentov, sklenených pomôcok a vybavenia na výsledky založené na TEQ a BEQ.
- 3.6. Vykoná sa slepá skúška, a to uskutočnením celého postupu analýzy, pri ktorom sa vynechá iba vzorka.
- 3.7. Pokiaľ ide o bioanalytické metódy, testujú sa všetky sklené pomôcky a všetky rozpúšťadlá používané pri analýze, aby sa potvrdila neprítomnosť zlučénin rušiacich detekciu cieľových zlučénin v pracovnom rozsahu. Sklené pomôcky sa opláchnu rozpúšťadlami alebo zahrejú na teplotu vhodnú na odstránenie stôp PCDD/F, dioxínom podobných zlučénin a zlučénin spôsobujúcich interferenciu z jeho povrchu.
- 3.8. Na extrakciu sa musí zvoliť také množstvo vzorky, aby sa splnili požiadavky dostatočne nízkeho pracovného rozsahu zahrňujúceho najvyššie prípustné obsahy alebo akčné prahové hodnoty.
- 3.9. Špecifické postupy prípravky vzoriek použité pri skúmaných produktoch spĺňajú medzinárodne prijaté usmernenia.

⁽¹⁾ Bioanalytické metódy nie sú špecifické pre uvedené kongenéry zahrnuté v schéme TEF (Toxic Equivalency Factors). V extrakte vzorky môžu byť prítomné iné štrukturálne príbuzné AhR aktívne zložky prispievajúce k celkovej odozve. Preto výsledky bioanalytických testov nemôžu byť odhadom, ale skôr indikujú hodnoty TEQ vo vzorke.

▼ **M6****4. Požiadavky na laboratóriá**

- 4.1. Akreditáciu laboratórií uskutočňuje v súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaistiť, že laboratóriá zabezpečujú analytickú kvalitu. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025. V príslušnom prípade treba dodržiavať zásady opísané v technických usmerneniach pre odhad neistoty merania a kvantifikačných limitov pre analýzu PCDD/F a PCB ⁽¹⁾.
- 4.2. Laboratórna spôsobilosť sa dokazuje nepretržitou úspešnou účasťou v medzilaboratórnych štúdiách na stanovenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB v príslušných krmivových matriciach a koncentračných rozsahoch.
- 4.3. Laboratóriá, ktoré používajú skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek, nadviažu úzku spoluprácu s laboratóriami, ktoré používajú potvrdzujúcu metódu, a to tak na účely kontroly kvality, ako aj na potvrdenie výsledku analýzy podozrivých vzoriek.

5. Základné požiadavky, ktoré má spĺňať analytický postup pre dioxíny (PCDD/F) a dioxínom podobné PCB**5.1. Nízky pracovný rozsah a kvantifikačné limity**

V prípade PCDD/F sa stanoviteľné množstvá vzhľadom na mimoriadnu toxicitu niektorých z týchto zlúčenín musia nachádzať vo vyššom femto-gramovom (10^{-15} g) rozpätí. V prípade väčšiny kongenéro PCB už postačuje kvantifikačný limit na úrovni nanogramov (10^{-9} g). Pri meraní toxickjších dioxínom podobných kongenéro PCB (predovšetkým non-orto-substituovaných kongenéro) musí dolná medza pracovného rozsahu dosiahnuť nízke pikogramové (10^{-12} g) obsahy. Pre všetky ostatné kongenéry PCB je kvantifikačný limit v rozsahu nanogramov (10^{-9} g) dostatočný.

5.2. Vysoká selektivnosť (špecifickosť)

- 5.2.1. Žiada sa rozlíšenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB od množstva iných koextrahovaných a potenciálne vzájomne interferujúcich zlúčenín prítomných v koncentráciách až o niekoľko rádov vyšších ako je koncentrácia skúmaných analytov. V prípade metód GC-MS je potrebné rozlišovať medzi rôznymi kongenérmi, ako napríklad medzi toxickými (napr. sedemástimi 2,3,7,8-substituovanými PCDD/F a dvanástimi dioxínom podobnými PCB) a ostatnými kongenérmi.

- 5.2.2. Pomocou bioanalytických metód je možná detekcia cieľových zlúčenín ako sumy PCDD/F a/alebo dioxínom podobných PCB. Čistenie vzorky má za cieľ odstránenie zlúčenín spôsobujúcich výsledky vykazujúce falošný nesúlad alebo zlúčenín, ktoré môžu znížiť odozvu, čím spôsobujú výsledky vykazujúce falošný súlad.

5.3. Vysoká miera správnosti (pravdivosť výsledku merania a presnosť, zdánlivá výťažnosť biotestu)

- 5.3.1. V prípade metód GC-MS musí stanovenie poskytnúť právoplatný odhad skutočnej koncentrácie vo vzorke. Vyžaduje sa vysoká správnosť, aby sa predišlo odmietnutiu výsledku analýzy vzorky na základe nízkej spoľahlivosti stanoveného obsahu TEQ. Správnosť sa vyjadruje ako

⁽¹⁾ „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry“ (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food“ (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

▼ M6

pravdivosť (rozdiel medzi nameranou strednou hodnotou analytu v certifikovanom materiáli a jej certifikovanou hodnotou vyjadrenou ako percentuálny podiel tejto hodnoty) a *presnosť* (relatívna smerodajná odchýlka RSD_R vypočítaná z výsledkov nameraných za podmienok reprodukovateľnosti).

- 5.3.2. V prípade bioanalytických metód sa stanovuje zdanlivá výťažnosť biotestu. Zdanlivá výťažnosť biotestu je hodnota BEQ vypočítaná z kalibračnej krivky TCDD alebo PCB 126 korigovaná na slepý pokus a následne vydelená hodnotou TEQ stanovenou pomocou potvrdzujúcej metódy. Jej cieľom je korekcia faktorov, ako sú strata PCDD/F a dioxínom podobných zlúčenín počas extrakcie a procesu čistenia, spoluxtrahované zlúčeniny zvyšujúce alebo znižujúce odpoveď (agonistické a antagonistické účinky), kvalita preloženia krivkou alebo rozdiely medzi hodnotami TEF a relatívnej účinnosti (REP). Zdanlivá výťažnosť biotestu sa vypočíta z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnym kongenérnym profilom v oblasti príslušných sledovaných obsahov.

- 5.4. *Validácia v rozsahu najvyššieho prípustného obsahu a všeobecné opatrenia na kontrolu kvality*

- 5.4.1. Laboratóriá musia počas validačného postupu a rutínnej analýzy preukázať účinnosť metódy v rozsahu najvyššieho prípustného obsahu, napríklad na úrovni 0,5–násobku, 1–násobku a 2–násobku najvyššieho prípustného obsahu s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu.

- 5.4.2. Pravidelné slepé kontroly a pokusy na vzorkách s prídavkom analytu alebo analýza kontrolných vzoriek (ak je to možné, tak najlepšie certifikovaného referenčného materiálu) sa vykonávajú v rámci vnútorných opatrení kontroly kvality. Vyhотовia a overia sa tabuľky kontroly kvality zo slepých kontrol, z pokusov na vzorkách s prídavkom analytu alebo analýz kontrolných vzoriek s cieľom zabezpečiť, aby bolo vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami.

- 5.5. *Kvantifikačný limit*

- 5.5.1. Pri bioanalytickej skríningovej metóde nie je stanovenie kvantifikačného limitu (LOQ) nevyhnutnou požiadavkou, ale pomocou tejto metódy musí byť možné rozlišovať medzi slepou a medznou hodnotou. Pri stanovovaní BEQ sa stanovuje medza oznamovania pre nakladanie so vzorkami vykazujúcimi odozvu pod touto hodnotou. Musí sa preukázať, že príslušná medza oznamovania sa aspoň trojnásobne odlišuje od slepých vzoriek použitých pri postupe, ktoré vykazujú odozvu pod pracovným rozsahom. Vypočíta sa preto zo vzoriek obsahujúcich cieľové zlúčeniny v koncentrácii približujúcej sa požadovanej minimálnej hladine, a nie na základe pomeru signál-šum (S/N) alebo testu naslepo.

- 5.5.2. LOQ pre potvrdzujúcu metódu musí byť približne jedna pätina najvyššieho prípustného obsahu.

- 5.6. *Analytické kritériá*

V záujme dosiahnutia spoľahlivých výsledkov pomocou potvrdzujúcich alebo skríningových metód je nutné splniť tieto kritériá v rozsahu najvyššieho prípustného obsahu, pokiaľ ide o hodnotu TEQ a BEQ, či už stanovenú ako celkový TEQ alebo celkový BEQ (ako suma PCDD/F a dioxínom podobných PCB), alebo samostatne pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB:

▼ **M6**

	Skríning pomocou bioanalytických alebo fyzikálno-chemických metód	Potvrdzujúce metódy
Miera výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad (*)	< 5 %	
Pravdivosť		– 20 % až + 20 %
Opakovateľnosť (RSD _r)	< 20 %	
Vnútrolaboratórna presnosť (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Pokiaľ ide o najvyššie prípustné obsahy.

5.7. *Špecifické požiadavky na skríningové metódy*

5.7.1. Pri skríningu je možné použiť metódy GC-MS, ako aj bioanalytické metódy. V prípade metód GC-MS musia byť splnené požiadavky stanovené v bode 6. Špecifické požiadavky na bunkové bioanalytické metódy sú stanovené v bode 7.

5.7.2. Laboratória používajúce skríningové metódy na rutinnú kontrolu vzoriek nadväzujú úzku spoluprácu s laboratóriami používajúcimi potvrdzujúcu metódu.

5.7.3. Overenie výkonnosti skríningovej metódy sa požaduje počas rutinnej analýzy kontrolou kvality analýzy a priebežnou validáciou metódy. Musí fungovať nepretržitý program kontroly výsledkov vykazujúcich súlad.

5.7.4. Kontrola možnej supresie bunkovej odozvy a cytotoxicity:

Uskutoční sa meraním 20 % extraktov vzoriek rutinným skríningom bez pridania a s pridaním 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-p-dioxínu v množstve zodpovedajúcom najvyššiemu prípustnému obsahu alebo akčnej prahovej hodnote s cieľom zistiť, či môže byť odozva potenciálne potlačená z dôvodu interferujúcich látok prítomných v extrakte vzorky. Meraná koncentrácia vzorky s pridanými analytmi sa porovnáva so sumou koncentrácie extraktu bez pridaných analytov a koncentrácie pridaného analytu. Ak je táto meraná koncentrácia nižšia o viac ako 25 % ako vypočítaná (sčítaná) koncentrácia, je to indikácia možného potlačenia (supresie) signálu a príslušná vzorka sa predkladá na potvrdzujúcu analýzu GC-HRMS. Výsledky sa monitorujú pomocou diagramov kontroly kvality.

5.7.5. Kontrola kvality vzoriek vykazujúcich súlad:

Približne 2 až 10 % vzoriek vykazujúcich súlad (v závislosti od vzorkovej matrice a laboratórnych skúseností) sa potvrdzuje analýzou GC/HRMS.

5.7.6. Stanovenie miery výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad na základe údajov získaných v rámci kontroly kvality:

Stanovuje sa miera výskytu výsledkov vykazujúcich falošný súlad pri skríningu vzoriek pod a nad najvyšším prípustným obsahom alebo akčnou prahovou hodnotou. Skutočná miera výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad musí byť nižšia ako 5 %. Ak sa získa aspoň 20 potvrdených výsledkov na maticu/skupinu matic z kontroly kvality

▼ **M6**

vzoriek vykazujúcich súlad, na základe tohto súboru údajov sa vyvodzujú závery o miere výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad. Výsledky zo vzoriek analyzovaných v kruhových testoch alebo v prípadoch kontaminácie, ktoré sa nachádzajú v koncentračnom rozpätí až do napríklad dvojnásobku najvyššieho prípustného obsahu (ML), môžu byť takisto zahrnuté medzi príslušné minimálne množstvo 20 výsledkov pre vyhodnocovanie miery výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad. Vzorky musia pokryť najčastejšie kongenénové profily a reprezentovať rozličné zdroje.

Hoci skríningové testy majú v prvom rade za cieľ detekciu vzoriek prekračujúcich akčnú prahovú hodnotu, kritérium pre stanovenie miery výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad je najvyšší prípustný obsah, berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania potvrdzujúcej metódy.

- 5.7.7. Vzorky potenciálne vykazujúce nesúlad pri skríningu sa vždy overujú úplnou opätovnou analýzou pôvodnej vzorky potvrdzujúcou metódou analýzy. Tieto vzorky sa môžu takisto použiť na hodnotenie miery výskytu výsledkov vykazujúcich falošný nesúlad. V prípade skríningových metód je mierou výskytu výsledkov vykazujúcich falošný nesúlad časť výsledkov, v prípade ktorých sa potvrdzujúcou analýzou potvrdil súlad, hoci vzorka bola na základe predchádzajúceho skríningu označená za vzorku, ktorá potenciálne vykazuje nesúlad. Vyhodnotenie výhod skríningovej metódy sa zakladá na porovnaní vzoriek vykazujúcich falošný nesúlad s celkovým počtom skontrolovaných vzoriek. Táto miera musí byť dostatočne nízka nato, aby bolo možné považovať nástroj skríningu za výhodný.

- 5.7.8. Bioanalytické metódy poskytujú aspoň v podmienkach validácie platnú indikáciu hodnoty TEQ, vypočítanej a vyjadrenej ako BEQ.

Takisto v prípade bioanalytických metód vykonaných za podmienok opakovateľnosti by mala byť vnútrolaboratórna RSD_r menšia ako za podmienok reprodukovateľnosti (RSD_R).

6. Špecifické požiadavky na metódy GC-MS, ktoré je potrebné splniť na účely skríningu alebo potvrdzovania

- 6.1. *Prijateľné rozdiely medzi hornou a dolnou medzou výsledkov WHO-TEQ*

Rozdiel medzi hornou a dolnou medzou nesmie presiahnuť 20 % na potvrdenie prekročenia najvyššieho prípustného obsahu alebo v prípade potreby akčných prahových hodnôt.

6.2. *Kontrola výťažnosti*

- 6.2.1. Na účely validácie analytického postupu sa na úplnom začiatku analytickej metódy, napr. pred extrakciou, pridajú ^{13}C -označené 2,3,7,8-chlór-substituované vnútorné (extrakčné) štandardy PCDD/F a ^{13}C -označené vnútorné štandardy dioxínom podobných PCB. Pre každú tetra- až okta-chlórovanú homológovú skupinu PCDD/F sa pridá aspoň jeden kongenér a aspoň jeden kongenér pre každú homológovú skupinu dioxínom podobných PCB (prípadne aspoň jeden kongenér pre každý sledovaný hmotnostno-spektrometrický ión použitý na monitorovanie PCDD/F a dioxínom podobných PCB). V prípade potvrdzujúcich metód sa použije všetkých 17 ^{13}C -označených 2,3,7,8-substituovaných vnútorných (extrakčných) štandardov PCDD/F a všetkých 12 ^{13}C -označených vnútorných štandardov dioxínom podobných PCB.

▼ **M6**

6.2.2. Použitím vhodných kalibračných roztokov sa stanovujú relatívne odozovové faktory aj pre tie kongenéry, pre ktoré nebol pridaný ^{13}C -označený ekvivalent.

6.2.3. Ak ide o krmivá rastlinného pôvodu a krmivá živočíšneho pôvodu, ktoré obsahujú menej ako 10 % tuku, potom sa vnútorné štandardy pridávajú povinne pred extrakciou. V prípade krmív živočíšneho pôvodu obsahujúcich viac ako 10 % tuku sa vnútorné štandardy pridávajú pred extrakciou tuku alebo po nej. V závislosti od toho, v ktorej fáze sa pridávajú vnútorné štandardy, sa vykoná vhodná validácia účinnosti extrakcie.

6.2.4. Pred analýzou pomocou GC-MS sa musia pridať 1 alebo 2 (náhradné) štandardy.

6.2.5. Vyžaduje sa kontrola výťažnosti. Výťažnosti jednotlivých vnútorných štandardov by sa mali v prípade potvrdzujúcich metód pohybovať v rozsahu 60 až 120 %. Vyššie alebo nižšie výťažnosti pre jednotlivé kongenéry, najmä pre niektoré hepta- a okta- chlórované dibenzo-p-dioxíny a dibenzofurány, sú prijateľné za podmienky, že ich podiel na hodnote TEQ neprekročí 10 % z celkovej hodnoty TEQ (vyjadrenej ako suma PCDD/F a dioxínom podobných PCB). Pri skríningových metódach GC-MS sa musia výťažnosti pohybovať v rozpätí 30 až 140 %.

6.3. *Odstránenie interferujúcich látok*

— Separácia PCDD/F od interferujúcich chlórovaných zlúčenín, ako sú dioxínom nepodobné PCB a chlórované difenylétery, sa vykonáva vhodnými chromatografickými postupmi (pokiaľ možno na kolóne s florisilom, oxidom hlinitým a/alebo aktívnym uhlím).

— Separácia izomérov plynovou chromatografiou má byť < 25 % údolie medzi píkmi 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrácia na základe štandardnej krivky*

Rozsah kalibračnej krivky musí pokrývať príslušnú oblasť najvyššieho prípustného obsahu alebo akčných prahových hodnôt.

6.5. *Špecifické kritériá pre potvrdzujúce metódy*

— Pre GC-HRMS:

Pri HRMS má byť rozlíšenie 10 000 a viac pre celý rozsah hmotností pri 10 % údolí.

Splnenie ďalších identifikačných a potvrdzujúcich kritérií opísaných v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC-HRMS a indikátorových PCB metódou GC-HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien.

— Pre GC-MS/MS:

Monitorovanie minimálne 2 špecifických prekurzorových iónov, každý s jedným konkrétnym zodpovedajúcim produktovým iónom pre všetky označené a neoznačené analyty v rozsahu analýzy.

Maximálna povolená odchýlka relatívnych intenzít iónov je $\pm 15\%$ pre vybrané produktové ióny v porovnaní s vypočítanými alebo nameranými hodnotami (priemer kalibračných štandardov) za rovnakých podmienok MS/MS, najmä pokiaľ ide o kolíznú energiu a tlak plynu pri zrážke, pre každý prechod analytu.

▼ **M6**

Rozlíšenie každého kvadrupólu má byť rovnaké alebo lepšie ako rozlíšenie hmotnostnej jednotky (rozlíšenie hmotnostnej jednotky: rozlíšenie dostatočné na oddelenie dvoch pík s rozdielom jednej hmotnostnej jednotky), aby sa minimalizovali možné interferencie so sledovanými analytmi.

Splnenie ďalších kritérií je opísané v medzinárodne uznávaných normách, napríklad v norme EN 16215:2012 (Krmivá pre zvieratá. Stanovenie dioxínov a dioxínom podobných PCB metódou GC-HRMS a indikátorových PCB metódou GC-HRMS) a/alebo v metódach EPA 1613 a 1668, v znení zmien, okrem povinnosti používať metódu GC-HRMS.

7. Špecifické požiadavky na bioanalytické metódy

Bioanalytické metódy sú metódy založené na využívaní biologických princípov, ako sú bunkové testy, receptorové testy alebo imunologické testy. V tomto bode 7 sú stanovené požiadavky na bioanalytické metódy ako také.

Skríningová metóda klasifikuje v princípe vzorku ako vzorku, ktorá vykazuje súlad, alebo ako vzorku, v prípade ktorej existuje podozrenie na nesúlad. Na tieto účely sa vypočítaná hodnota BEQ porovná s medznou hodnotou (pozri bod 7.3). Vzorky pod medznou hodnotou sa vyhlásia za vzorky vykazujúce súlad, vzorky rovnajúce sa medznej hodnote alebo nad ňou sú vzorky, v prípade ktorých existuje podozrenie na nesúlad, a teda si vyžadujú analýzu pomocou potvrdzujúcej metódy. Hodnota BEQ zodpovedajúca dvom tretinám najvyššieho prípustného obsahu môže v praxi poslúžiť ako medzná hodnota, pokiaľ je zabezpečené, že miera výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad je nižšia ako 5 % a miera výskytu výsledkov vykazujúcich falošný nesúlad je známa. Pri použití samostatných najvyšších prípustných obsahov pre PCDD/F a pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB si overenie súladu vzoriek bez frakcionácie vyžaduje vhodné medzné hodnoty pre biologické testy na PCDD/F. Na kontrolu vzoriek prekračujúcich akčné prahové hodnoty je vhodné použiť ako medznú hodnotu primerané percento príslušnej akčnej prahovej hodnoty.

Ak je indikatívna hodnota vyjadrená v BEQ, výsledky vzoriek musia byť vyjadrené v pracovnom rozsahu a presahovať medzu oznamovania (pozri body 7.1.1 a 7.1.6).

7.1. Hodnotenie odozvy testu

7.1.1. Všeobecné požiadavky

— Pri výpočte koncentrácií z kalibračnej krivky TCDD vykážu horné medzné hodnoty krivky veľkú odchýlku (vysoký variačný koeficient – CV). Pracovný rozsah je oblasť, v ktorej je CV menší ako 15 %. Dolná medza pracovného rozsahu (medza oznamovania) musí byť najmenej trojnásobne vyššia ako slepé vzorky. Hornú medzu pracovného rozsahu obvykle predstavuje hodnota EC₇₀ (70 % maximálnej účinnej koncentrácie), ale je nižšia, ak je CV vyšší ako 15 % v tomto rozsahu. Pracovný rozsah sa stanovuje pri validácii. Medzné hodnoty (pozri bod 7.3) musia byť v rámci pracovného rozsahu.

— Štandardné roztoky a vzorkové extrakty sa testujú trikrát alebo aspoň dvakrát. Odozva alebo koncentrácia štandardných roztokov alebo kontrolných extraktov pri dvojitém testovaní v štyroch až šiestich jamkách rozložených na platni by mala mať CV < 15 % (možné len v rámci pracovného rozsahu).

▼ **M6**

7.1.2. Kalibrácia

7.1.2.1. Kalibrácia na základe štandardnej krivky

- Odhad obsahov vo vzorkách sa vykonáva na základe porovnania odozvy testu s kalibračnou krivkou TCDD (alebo PCB 126 alebo štandardnej zmesi PCDD/PCDF/dioxínom podobných PCB) s cieľom vypočítať hodnotu BEQ v extrakte a následne vo vzorke.
- Kalibračné krivky obsahujú osem až dvanásť koncentrácií (aspoň dvojmo) s dostatočným počtom koncentrácií v nižšej časti krivky (pracovnom rozsahu). Osobitnú pozornosť treba venovať kvalite preloženia krivky v pracovnom rozsahu. Ako taká má hodnota R^2 malú alebo žiadnu hodnotu pre odhad správnosti preloženia pri nelineárnej regresii. Lepšie preloženie krivky sa dosiahne minimalizáciou rozdielu medzi vypočítanými a pozorovanými hladinami v pracovnom rozsahu krivky, napríklad metódou najmenších štvorcov.
- Pri odhade obsahu v extrakte vzorky sa následne vykoná korekcia na hodnotu BEQ vypočítanú pre slepú vzorku matrice alebo rozpúšťadla (aby sa zohľadnili nečistoty pochádzajúce z použitých rozpúšťadiel a chemikálií) a zdanlivú výťažnosť (vypočítanú z hodnoty BEQ vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérnymi profilmi v oblasti najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty). Na vykonanie korekcie výťažnosti musí byť zdanlivá výťažnosť vždy v požadovanom rozsahu (pozri bod 7.1.4). Referenčné vzorky použité na korekciu výťažnosti musia byť v súlade s požiadavkami uvedenými v bode 7.2.

7.1.2.2. Kalibrácia pomocou referenčných vzoriek

Alternatívne sa môže použiť kalibračná krivka zostrojená z aspoň štyroch referenčných vzoriek (pozri bod 7.2.4): jedna slepá matrica plus tri referenčné vzorky s 0,5-, 1,0- a 2,0-násobkom najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty, pričom nie je potrebné vykonať korekciu na slepú vzorku a výťažnosť, ak vlastnosti matrice referenčných vzoriek zodpovedajú vlastnostiam neznámych vzoriek. V tomto prípade môže byť odozva testu zodpovedajúca dvom tretinám najvyššieho prípustného obsahu (pozri bod 7.3) vypočítaná priamo z týchto vzoriek a použitá ako medzná hodnota. Na kontrolu vzoriek prekračujúcich akčné prahové hodnoty sa ako medzná hodnota použije primeraný percentuálny podiel z týchto akčných prahových hodnôt.

7.1.3. Oddelené stanovenie PCDD/F a dioxínom podobných PCB

Extrakty sa môžu rozdeliť do frakcií obsahujúcich PCDD/F a dioxínom podobné PCB, čím sa umožní samostatné stanovenie hladín TEQ (v BEQ) pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB. Na hodnotenie výsledkov pre frakciu obsahujúcu dioxínom podobné PCB sa prednostne používa štandardná kalibračná krivka PCB 126.

7.1.4. Zdanlivé výťažnosti biotestu

„Zdanlivá výťažnosť biotestu“ sa vypočítava z vhodných referenčných vzoriek s reprezentatívnymi kongenérnymi profilmi v oblasti najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty a vyjadruje sa ako percentuálny podiel hodnoty BEQ v porovnaní s hodnotou TEQ. V závislosti od použitého typu testu a použitej schémy TEF ⁽¹⁾ môžu rozdiely medzi faktormi TEF a REP pre dioxínom podobné PCB spôsobovať nízke zdanlivé výťažnosti pre dioxínom podobné PCB v porovnaní s PCDD/F. Preto v prípade samostatného stanovovania PCDD/F

⁽¹⁾ Súčasné požiadavky sú založené na TEF uverejnených v publikácii: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M6**

a dioxínom podobných PCB sú biotestové zdanlivé výťažnosti: pre dioxínom podobné PCB na úrovni 20 až 60 %, pre PCDD/F 50 až 130 % (rozsahy sa uplatňujú pri použití kalibračnej krivky TCDD). Keďže podiel dioxínom podobných PCB na sume PCDD/F a dioxínom podobných PCB môže byť rôzny v prípade rôznych matric a vzoriek, zdanlivé výťažnosti biotestu pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB odzrkadľujú tieto rozsahy a nachádzajú sa medzi 30 a 130 %. Akýkoľvek vplyv do značnej miery zrevidovaných hodnôt TEF pre právne predpisy Únie týkajúce sa PCDD/F a dioxínom podobných PCB si vyžaduje revíziu týchto rozsahov.

7.1.5. Kontrola výťažností čistenia

Pri validácii sa kontroluje strata zlúčenín, ku ktorej došlo pri čistení. Slepá vzorka s prídavkom zmesi rozličných kongenéroov sa podrobuje čisteniu (aspoň $n = 3$) a pomocou potvrdzujúcej metódy sa overuje výťažnosť a variabilita. Výťažnosť sa musí nachádzať v rozpätí 60 až 120 % predovšetkým v prípade kongenéroov s podielom na hodnote TEQ v rozličných zmesiach vyšším ako 10 %.

7.1.6. Medza oznamovania

Pri uvádzaní hodnôt BEQ sa medza oznamovania stanovuje z príslušných vzoriek matric vykazujúcich typické kongenérové profily, nie však z kalibračnej krivky štandardov vzhľadom na malú presnosť v nižšej oblasti krivky. Musia sa zohľadniť účinky extrakcie a čistenia. Medza oznamovania musí byť stanovená aspoň trojnásobne nad slepými vzorkami.

7.2. Používanie referenčných vzoriek

7.2.1. Referenčné vzorky predstavujú vzorkovú maticu, kongenérové profily a koncentračné rozsahy pre PCDD/F a dioxínom podobné PCB v oblasti najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty.

7.2.2. Do každej testovacej série sa zahrnie slepá matica, alebo ak to nie je možné, slepá vzorka, ako aj referenčná vzorka vykazujúca najvyšší prípustný obsah alebo akčnú prahovú hodnotu. Tieto vzorky sa extrahujú a testujú súčasne a pri identických podmienkach. Referenčná vzorka musí vykázať zreteľne silnejšiu reakciu v porovnaní so slepou vzorkou, čím sa zabezpečí vhodnosť príslušného testu. Uvedené vzorky sa môžu použiť na korekciu slepých vzoriek a výťažností.

7.2.3. Referenčné vzorky vybrané na korekciu výťažností musia byť reprezentatívne pre testovacie vzorky, čiže kongenérové profily nesmú viesť k podhodnoteniu obsahov.

7.2.4. Na preukázanie správnej funkcie testu v skúmanom rozsahu sa na kontrolu najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty môžu použiť dodatočné referenčné vzorky vykazujúce napr. 0,5- a 2,0-násobok najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty. Kombinácia týchto vzoriek môže poslúžiť na výpočet hodnôt BEQ v testovacích vzorkách (pozri bod 7.1.2.2).

▼ M6

7.3. Stanovenie medzných hodnôt

Stanovuje sa pomer medzi bioanalytickými výsledkami v BEQ a výsledkami potvrdzujúcej metódy v TEQ, napríklad pomocou kalibračných experimentov zohľadňujúc príslušnú maticu, pri použití referenčných vzoriek s prídavkom analytov v množstve 0-, 0,5-, 1,0- a 2,0-násobku ML, so šiestimi opakovaniami pri každom obsahu ($n = 24$). Korekčné faktory (slepý pokus a výťažnosť) možno z tohto vzťahu odhadnúť, skontrolujú sa však podľa bodu 7.2.2.

Medzné hodnoty sa stanovujú na účely rozhodovania o tom, či sú vzorky v súlade s najvyššími prípustnými obsahmi, resp. na účely kontroly akčných prahových hodnôt, ak sú relevantné, a to s príslušnými najvyššími prípustnými obsahmi alebo akčnými prahovými hodnotami stanovenými buď zvlášť pre PCDD/F a pre dioxínom podobné PCB, alebo pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB. Predstavujú *dolnú* medzu distribúcie bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) zodpovedajúcich rozhodovaciemu limitu potvrdzujúcej metódy pri 95 % úrovni spoľahlivosti, čiže pri nižšej ako 5 % miere výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad, a pri $RSD_R < 25$ %. Rozhodovací limit potvrdzujúcej metódy je najvyšší prípustný obsah berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania.

Medzná hodnota (v BEQ) sa môže vypočítať v súlade s jedným z prístupov stanovených v bodoch 7.3.1, 7.3.2 a 7.3.3 (pozri obrázok 1).

7.3.1. Použitie *dolného* pásma 95 % predikčného intervalu rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy

$$\text{medzná hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pričom:

BEQ_{DL} BEQ zodpovedajúce rozhodovaciemu limitu potvrdzujúcej metódy je najvyšší prípustný obsah berúc do úvahy rozšírenú neistotu merania

$s_{y,x}$ smerodajná odchýlka rezíduí

$t_{\alpha, f=m-2}$ Studentov koeficient ($\alpha = 5$ %, f = počet stupňov voľnosti, jednostranný)

m celkový počet kalibračných bodov (index j)

n počet opakovaní pri každom obsahu

x_i koncentrácia vzorky (v TEQ) kalibračného bodu i stanovená potvrdzujúcou metódou

$\bar{x}$ stredná hodnota koncentrácií (v TEQ) všetkých kalibračných vzoriek

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \text{ parameter súčtu štvorcov, } i = \text{index pre kalibračný bod } i$$

7.3.2. Výpočet z bioanalytických výsledkov (korigovaných na slepý pokus a výťažnosť) viacnásobne opakovaných analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy predstavujúceho *dolnú* medzu distribúcie dát pri zodpovedajúcej strednej hodnote BEQ:

$$\text{medzná hodnota} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pričom:

SD_R je smerodajná odchýlka výsledkov biotestu BEQ_{DL} nameraných za podmienok vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti

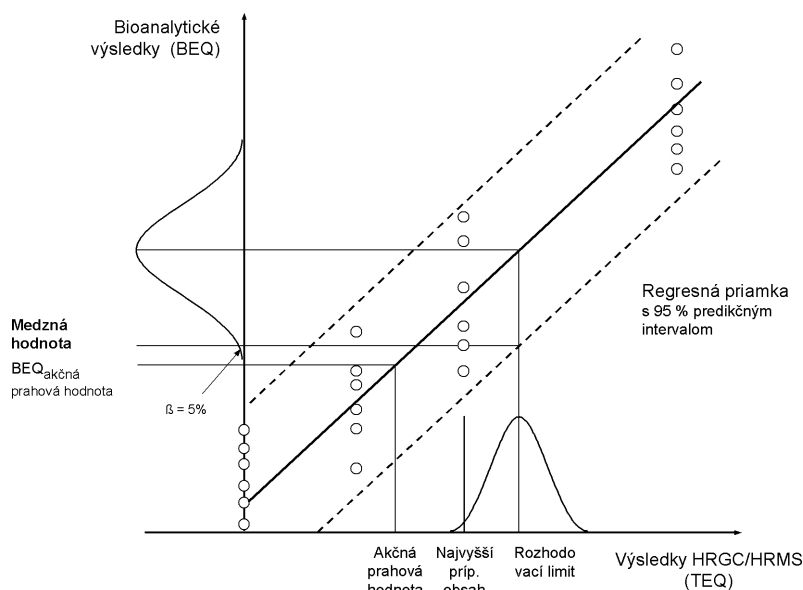
▼ **M6**

- 7.3.3. Výpočet ako stredná hodnota bioanalytických výsledkov (v BEQ, korigovaných vzhľadom na slepý pokus a výťažnosť) z mnohých analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni dvoch tretín najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty, na základe poznatku, že tento obsah sa bude pohybovať okolo medznej hodnoty stanovenej v bode 7.3.1 alebo bode 7.3.2:

Výpočet medzných hodnôt pri 95 % úrovni spoľahlivosti, čiže pri miere výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad nižšej ako 5 % a pri $RSD_R < 25$ %:

1. na základe *dolného* pásma 95 % predikčného intervalu pri rozhodovaní limite potvrdzujúcej metódy;
2. na základe radu analýz vzoriek ($n \geq 6$) kontaminovaných na úrovni rozhodovacieho limitu potvrdzujúcej metódy ako *dolná* medza dátovej distribúcie (znázornenej na obrázku zvonovitou krivkou) pri zodpovedajúcej strednej hodnote BEQ.

Obrázok 1



- 7.3.4. Obmedzenia týkajúce sa medzných hodnôt

Medzné hodnoty vychádzajúce z BEQ a vypočítané z RSD_R získanej pri validácii použitím obmedzeného počtu vzoriek s rozličnými maticami/kongenéróvymi profilmi môžu byť vyššie ako najvyššie prípustné obsahy alebo akčné prahové hodnoty vyjadrené v TEQ z dôvodu vyššej presnosti, než akú možno bežne doceliť v prípade, že sa analyzuje neznáme spektrum možných kongenéróvych profilov. V takýchto prípadoch sa medzné hodnoty vypočítavajú z $RSD_R = 25$ % alebo sa zvolí výpočet odvodený z dvoch tretín najvyššieho prípustného obsahu alebo akčnej prahovej hodnoty.

7.4. Charakteristiky účinnosti

- 7.4.1. Keďže pri biologických metódach nie je možné využívať žiadne vnútorné štandardy, je nutné vykonávať testy opakovateľnosti bioanalytických metód na získanie informácií o smerodajnej odchýlke v rámci jednej testovacej série, ako aj medzi jednotlivými testovacími sériami. Opakovateľnosť musí byť nižšia ako 20 % a vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť nižšia ako 25 %. Vychádza sa z vypočítaných hodnôt v BEQ korigovaných na slepé vzorky a výťažnosť.

▼ M6

- 7.4.2. Súčasťou procesu validácie je preukázanie toho, že testy rozlišujú medzi slepou vzorkou a obsahom na úrovni medznej hodnoty, aby bolo možné identifikovať vzorky s vyšším obsahom ako je príslušná medzná hodnota (pozri bod 7.1.2).
- 7.4.3. Je nutné definovať cieľové zlúčeniny, možné interferencie a najvyššie prijateľné obsahy v slepých vzorkách.
- 7.4.4. Smerodajná odchýlka vyjadrená v percentách, ktorá sa týka odozvy alebo koncentrácie vypočítanej na základe odozvy (možnej len v pracovnom rozsahu), nesmie byť pri trojnásobnom stanovovaní extraktu vzorky vyššia ako 15 %.
- 7.4.5. Nekorigované výsledky referenčných vzoriek vyjadrené v BEQ (slepý pokus a najvyšší prípustný obsah alebo akčná prahová hodnota) sa používajú na vyhodnotenie účinnosti príslušnej bioanalytickej metódy počas konštantného časového obdobia.
- 7.4.6. Diagramy kontroly kvality pre slepé vzorky metódy a každý typ referenčnej vzorky sa zaznamenávajú a kontrolujú s cieľom zabezpečiť, aby bolo vykonanie analýzy v súlade s požiadavkami, predovšetkým pokiaľ ide o slepé vzorky a v súvislosti s nimi o požadovaný minimálny odstup od dolnej medze pracovného rozsahu, ako aj o referenčné vzorky a v súvislosti s nimi o vnútolaboratórnu reprodukovateľnosť. Slepé vzorky metódy sa musia dôkladne skontrolovať s cieľom predísť výskytu výsledkov vykazujúcich falošný súlad po odpočítaní.
- 7.4.7. Výsledky analýz podozrivých vzoriek a 2 až 10 % vzoriek vykazujúcich súlad (minimálne 20 vzoriek na matricu) pomocou potvrdzujúcich metód sa zhromažďujú a používajú na vyhodnotenie účinnosti skríningovej metódy a vzťahu medzi BEQ a TEQ. Tento súbor údajov sa môže použiť na prehodnotenie medzných hodnôt aplikovateľných na rutinné vzorky v prípade validovaných matric.
- 7.4.8. Úspešnosť metódy sa môže preukázať takisto účasťou na kruhových testoch. Výsledky zo vzoriek analyzovaných v rámci kruhových testov, ktoré sa nachádzajú v koncentračnom rozpätí až do napr. dvojnásobku najvyššieho prípustného obsahu, sa môžu zahrnúť do vyhodnocovania miery výskytu meraní vykazujúcich falošný súlad, ak je laboratórium schopné preukázať svoju úspešnú výkonnosť. Vzorky musia pokryť najčastejšie kongenénové profily a reprezentovať rozličné zdroje.
- 7.4.9. V prípadoch kontaminácie sa môžu medzné hodnoty prehodnotiť tým spôsobom, že sa zohľadní špecifická matrica a kongenénové profily tohto konkrétneho prípadu.

8. Oznamovanie výsledkov**8.1. Potvrdzujúce metódy**

- 8.1.1. Analytické výsledky musia zahŕňať obsahy jednotlivých kongenénov PCDD/F a dioxínom podobných PCB a hodnoty TEQ musia byť uvedené ako dolná, horná a stredná medza, aby sa pri uvádzaní výsledkov zahrnulo čo najviac informácií, a tak umožnilo interpretovať výsledky v súlade s osobitnými požiadavkami.
- 8.1.2. Správa musí zahŕňať metódu použitú na extrahovanie PCDD/F a dioxínom podobných PCB.

▼ **M6**

- 8.1.3. Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa musia poskytnúť v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo oblasti uvedenej v bode 6.2.5, v prípade, že sa prekročí najvyšší prípustný obsah (v tomto prípade sa poskytujú údaje o výťažnosti jednej z dvoch dvojnásobných analýz), a v ostatných prípadoch na požiadanie.
- 8.1.4. Keďže je pri rozhodovaní o súlade vzorky nutné zohľadniť nepresnosť merania, tento parameter musí byť k dispozícii. Preto sa analytické výsledky uvádzajú ako „x +/- U“, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania pri použití koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % úroveň spoľahlivosti. V prípade samostatného stanovenia PCDD/F a dioxínom podobných PCB sa pre sumu PCDD/F a dioxínom podobných PCB používa suma odhadovanej rozšírenej neistoty samostatných analytických výsledkov PCDD/F a dioxínom podobných PCB.
- 8.1.5. Výsledky sa vyjadrujú v rovnakých jednotkách a s najmenej rovnakým počtom číslíc, ako sú najvyššie prípustné obsahy stanovené smernicou 2002/32/ES.
- 8.2. *Bioanalytické skríningové metódy*
- 8.2.1. Výsledok skríningu sa vyjadruje ako „v súlade“ alebo „podozrenie na nesúlad“ („podozrenie“).
- 8.2.2. Okrem toho sa môže uvádzať indikatívny výsledok pre PCDD/F a/alebo dioxínom podobné PCB vyjadrené v BEQ a nie TEQ.
- 8.2.3. Vzorky vykazujúce odozvu pod medzou oznamovania sa musia označiť ako vzorky „pod medzou oznamovania“. Vzorky vykazujúce odozvu nad pracovným rozsahom sa musia označiť ako vzorky „presahujúce pracovný rozsah“ a obsah zodpovedajúci hornej medzi pracovného rozsahu sa musí uvádzať v BEQ.
- 8.2.4. Pre každý typ matrice sa v správe uvádza najvyšší prípustný obsah alebo akčná prahová hodnota, z ktorej vychádza hodnotenie.
- 8.2.5. V správe sa uvádza druh použitého testu, jeho základný princíp a druh kalibrácie.
- 8.2.6. Správa musí zahŕňať metódu použitú na extrahovanie PCDD/F a dioxínom podobných PCB.
- 8.2.7. V prípade vzoriek, pri ktorých je podozrenie na nesúlad, musí správa obsahovať poznámku o opatreniach, ktoré je potrebné prijať. Prostredníctvom potvrdzujúcej metódy je potrebné stanoviť/potvrdiť koncentráciu PCDD/F a sumu koncentrácií PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách so zvýšenými obsahmi týchto látok.
- 8.2.8. Výsledky vykazujúce nesúlad sa oznamujú len vtedy, ak sa zistili na základe potvrdzujúcej analýzy.
- 8.3. *Fyzikálno-chemické skríningové metódy*
- 8.3.1. Výsledok skríningu sa vyjadruje ako „v súlade“ alebo „podozrenie na nesúlad“ („podozrenie“).
- 8.3.2. Pre každý typ matrice sa v správe uvádza najvyšší prípustný obsah alebo akčná prahová hodnota, z ktorej vychádza hodnotenie.

▼ M6

- 8.3.3. Okrem toho sa môžu uvádzať obsahy jednotlivých PCDD/F a dioxínom podobných kongenéroov PCB a hodnoty TEQ vyjadrené ako dolná, horná a stredná medza. Výsledky sa vyjadrujú v rovnakých jednotkách a s najmenej rovnakým počtom číslíc, ako sú najvyššie prípustné obsahy stanovené smernicou 2002/32/ES.
- 8.3.4. Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa musia poskytnúť v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo oblasti uvedenej v bode 6.2.5, v prípade, že sa prekročí najvyšší prípustný obsah (v tomto prípade sa poskytujú údaje o výťažnosti jednej z dvoch dvojnásobných analýz), a v ostatných prípadoch na požiadanie.
- 8.3.5. V správe sa musí uviesť, ktorá metóda GC-MS sa použila.
- 8.3.6. Správa musí zahŕňať metódu použitú na extrahovanie PCDD/F a dioxínom podobných PCB.
- 8.3.7. V prípade vzoriek, pri ktorých je podozrenie na nesúlad, musí správa obsahovať poznámku o opatreniach, ktoré je potrebné prijať. Prostredníctvom potvrdzujúcej metódy je potrebné stanoviť/potvrdiť koncentráciu PCDD/F a sumu koncentrácií PCDD/F a dioxínom podobných PCB vo vzorkách so zvýšenými obsahmi týchto látok.
- 8.3.8. O nesúlade sa môže rozhodnúť len potvrdzujúcou analýzou.

*KAPITOLA III****Príprava vzoriek a požiadavky na metódy analýzy, ktoré sa používajú pri úradnej kontrole obsahu dioxínom nepodobných PCB v krmivách*****1. Oblasť použitia**

Požiadavky, ktoré sú stanovené v tejto kapitole, sa uplatňujú v prípadoch, keď sa vykonáva analýza krmív na úradnú kontrolu obsahu dioxínom nepodobných PCB, a pokiaľ ide o prípravu vzoriek a analytické požiadavky na iné regulačné účely vrátane kontrol, ktoré vykonávajú prevádzkovatelia krmivárskych podnikov s cieľom zabezpečiť súlad s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 183/2005.

2. Použiteľné detekčné metódy

Plynová chromatografia/detekcia elektrónového záchytu (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS alebo rovnocenné metódy.

3. Identifikácia a potvrdzovanie skúmaných analytov

- 3.1. Relatívny retenčný čas vo vzťahu k vnútorným štandardom alebo referenčným štandardom (priateľná odchýlka $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Separácia dioxínom nepodobných PCB od interferujúcich látok, predovšetkým koeluovaných PCB, najmä ak sú obsahy vzoriek v oblasti zákonom stanovených medzi a nesúlad sa musí potvrdzovať⁽¹⁾.
- 3.3. Požiadavky na techniky GC-MS

Monitorovanie minimálne tohto počtu molekulových iónov alebo charakteristických iónov z molekulového klastra;

a) dvoch špecifických iónov v prípade HRMS;

⁽¹⁾ Kongenéry, v prípade ktorých je často zaznamenaná koeluácia, sú napr. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. V prípade GC-MS je takisto nevyhnutné uvažovať o možných interferenciách fragmentov vyšších chlórovaných kongenéroov.

▼ M6

- b) troch špecifických iónov v prípade LRMS;
- c) dvoch špecifických prekurzorových iónov, každého s jedným konkrétnym zodpovedajúcim produktovým iónom v prípade MS-MS.

Maximálne povolené tolerancie pomerov odoziev pre vybrané fragmenty hmoty:

Relatívna odchýlka pomeru odoziev vybraných fragmentov hmotností od teoretických pomerov odoziev alebo od pomerov odoziev kalibračných štandardov pre kvantifikačný ión (najintenzívnejší sledovaný ión) a dôkazové ióny: $\pm 15\%$

3.4. Požiadavky na techniky GC-ECD

Výsledky presahujúce najvyšší prípustný obsah sa potvrdzujú na dvoch stĺpcoch GC so stacionárnymi fázami rozličnej polarita.

4. Preukázanie účinnosti metódy

Účinnosť metódy sa validuje v rozsahu najvyššieho prípustného obsahu (0,5 až 2,0-násobok najvyššieho prípustného obsahu) s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu (pozri požiadavky na vnútrolaboratórnu presnosť v bode 9).

5. Kvantifikačný limit

Suma LOQ ⁽¹⁾ dioxínom nepodobných PCB nesmie byť vyššia ako jedna tretina najvyššieho prípustného obsahu ⁽²⁾.

6. Kontrola kvality

Pravidelné kontroly slepých vzoriek, analýzy vzoriek s prídavkom analytov, vzoriek na kontrolu kvality, účasť v medzilaboratórnych štúdiách relevantných matric.

7. Kontrola výťažnosti

7.1. Použijú sa vhodné vnútorné štandardy s fyzikálno-chemickými vlastnosťami porovnateľnými so sledovanými analytmi.

7.2. Pridávanie vnútorných štandardov:

Pridanie k výrobkom (pred procesom extrakcie a čistenia).

7.3. Požiadavky na metódy používajúce všetkých šesť izotopom označených dioxínom nepodobných kongenéro PCB:

- a) výsledky sa korigujú pre výťažnosti vnútorných štandardov;
- b) výťažnosti izotopom označených vnútorných štandardov sa musia pohybovať medzi 60 a 120 %;
- c) nižšie alebo vyššie výťažnosti individuálnych kongenéro PCB s podielom na sume dioxínom nepodobných PCB pod úrovňou 10 % sú prijateľné.

7.4. Požiadavky na metódy, pri ktorých sa nepoužíva všetkých šesť izotopicky označených vnútorných štandardov alebo iné vnútorné štandardy:

- a) výťažnosť vnútorných štandardov sa kontroluje pri každej vzorke;

⁽¹⁾ V príslušnom prípade treba dodržiavať zásady opísané v dokumente *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ Odporúča sa, aby bol podiel obsahu z reagenčnej slepej vzorky nižší ako obsah kontaminantu vo vzorke. Laboratórium je zodpovedné za kontrolu kolísania obsahov slepých vzoriek, najmä ak sa obsahy slepých vzoriek odpočítavajú.

▼ **M6**

b) výťažnosti vnútorných štandardov sa musia pohybovať medzi 60 a 120 %;

c) výsledky sa korigujú pre výťažnosti vnútorných štandardov.

- 7.5. Výťažnosti neoznačených kongenéroov sa overujú vzorkami s prídavkom analytov alebo vzorkami kontroly kvality s koncentráciami v rozsahu najvyššieho prípustného obsahu. Výťažnosti týchto kongenéroov sa považujú za prijateľné, ak sa pohybujú medzi 60 a 120 %.

8. Požiadavky na laboratória

Akreditáciu laboratórií uskutočňuje v súlade s ustanoveniami nariadenia (ES) č. 882/2004 uznávaný orgán, ktorý pôsobí v súlade s pokynom ISO 58 s cieľom zaistiť, že laboratória zabezpečujú analytickú kvalitu. Akreditácia laboratórií sa uskutočňuje v súlade s normou EN ISO/IEC 17025. Okrem toho treba v príslušnom prípade dodržiavať zásady opísané v dokumente *Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis* ⁽¹⁾.

9. Charakteristiky účinnosti: kritériá pre sumu dioxínom nepodobných PCB pre najvyšší prípustný obsah

	Izotopická zriedňovacia hmotnostná spektrometria ⁽¹⁾	Ostatné techniky
Pravdivosť	– 20 až + 20 %	– 30 až + 30 %
Vnútrolaboratórna presnosť (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Rozdiel medzi výpočtom hornej a dolnej medze	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Vyžaduje sa použitie všetkých šiestich ¹³C-označených ekvivalentov ako vnútorných štandardov.

10. Oznamovanie výsledkov

- 10.1. Analytické výsledky musia zahŕňať obsahy jednotlivých dioxínom nepodobných PCB a sumu tých kongenéroov PCB, ktoré sa uvádzajú ako dolná, horná a stredná medza, aby sa pri uvádzaní výsledkov zahrnulo čo najviac informácií, a tak umožnilo interpretovať výsledky v súlade s osobitnými požiadavkami.
- 10.2. Správa musí zahŕňať metódu použitú na extrahovanie PCB.
- 10.3. Údaje o výťažnostiach jednotlivých vnútorných štandardov sa poskytujú v prípade, že výťažnosti sa pohybujú mimo rozsahu uvedeného v bode 7, v prípade, že sa prekročí najvyšší prípustný obsah, a v ostatných prípadoch na požiadanie.
- 10.4. Keďže je pri rozhodovaní o súlade vzorky nutné zohľadniť nepresnosť merania, uvedený parameter musí byť takisto k dispozícii. Preto sa analytické výsledky uvádzajú ako „x ± U“, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania pri použití koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % úroveň spoľahlivosti.
- 10.5. Výsledky sa vyjadrujú v rovnakých jednotkách a s najmenej rovnakým počtom čísl, ako sú najvyššie prípustné obsahy stanovené smernicou 2002/32/ES.

⁽¹⁾ Súčasné požiadavky sú založené na TEF uverejnených v publikácii: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼ **M2**

PRÍLOHA VI

Metódy analýzy na stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu na účely úradných kontrol krmív▼ **M8**

1. ÚČEL A ROZSAH

Stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu v krmivách sa uskutočňuje pomocou svetelnej mikroskopie alebo polymerázovej reťazovej reakcie (*polymerase chain reaction* – PCR) v súlade s ustanoveniami uvedenými v tejto prílohe.

Tieto dve metódy umožňujú zistiť prítomnosť zložiek živočíšneho pôvodu v premixoch, krmných surovinách a krmných zmesiach. Neumožňujú však výpočet množstva takýchto zložiek v premixoch, krmných surovinách a krmných zmesiach. Obe metódy majú detekčný limit nižší ako 0,1 % (hm. %).

Metóda PCR umožňuje identifikáciu taxonomickej skupiny zložiek živočíšneho pôvodu, ktoré sú prítomné v premixoch, krmných surovinách a krmných zmesiach.

Tieto metódy sa použijú na kontrolu uplatňovania zákazov stanovených v článku 7 ods. 1 nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001 ⁽¹⁾, v prílohe IV k uvedenému nariadeniu a v článku 11 ods. 1 nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 ⁽²⁾.

V závislosti od druhu testovaného krmiva možno tieto metódy použiť v rámci jedného operačného protokolu, a to buď jednotlivo, alebo vo vzájomnej kombinácii, v súlade so štandardnými operačnými postupmi (*standard operating procedures* – SOP), ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách (EURL-AP) ⁽³⁾.

▼ **M2**

2. METÓDY

▼ **M8**

2.1. Svetelná mikroskopia

2.1.1. Princíp

Zložky živočíšneho pôvodu, ktoré sa môžu vyskytovať v premixoch, krmných surovinách a krmných zmesiach odoslaných na analýzu, sa zisťujú na základe typických a mikroskopicky identifikovateľných vlastností ako svalové vlákna a iné časti mäsa, chrupek, kosti, rohovina, srst', štetiny, kutikulárne fragmenty bezstavovcov, tracheálny systém hmyzu, výrobky z krvi, guľôčky mlieka, kryštály laktózy, perie, vaječné škrupiny, rybie kosti a šupiny.

⁽¹⁾ Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001 z 22. mája 2001, ktorým sa stanovujú pravidlá prevencie, kontroly a eradikácie niektorých prenosných spongiformných encefalopatií (Ú. v. ES L 147, 31.5.2001, s. 1).

⁽²⁾ Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 z 21. októbra 2009, ktorým sa ustanovujú zdravotné predpisy týkajúce sa vedľajších živočíšnych produktov a odvodených produktov určených na ľudskú spotrebu a ktorým sa zrušuje nariadenie (ES) č. 1774/2002 (nariadenie o vedľajších živočíšnych produktoch) (Ú. v. EÚ L 300, 14.11.2009, s. 1).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼M8

Mikroskopické skúmanie sa vykonáva po príprave vzoriek sedimentáciou.

Vzorky sa podrobia sedimentačnému kroku takto:

- a) na zisťovanie zložiek živočíšneho pôvodu iných ako suchozemské bezstavovce sa použije krok jednej sedimentácie tetrachlóretylénu (TCE), ako sa podrobne opisuje v bode 2.1.3.4.3;
- b) na zisťovanie zložiek suchozemských bezstavovcov sa použije krok dvojitej sedimentácie petroléru/tetrachlóretylénu (PE/TCE), ako sa podrobne opisuje v bode 2.1.3.4.4.

2.1.2. Činidlá a vybavenie

2.1.2.1. Činidlá

2.1.2.1.1. Zahusťovacie činidlo

- Tetrachlóretylén (špecifická hustota 1,62),
- Teplota varu petroléru (PE) 40 – 60 °C (špecifická hustota 0,65).

2.1.2.1.2. Vyfarbovacie činidlo

- Roztok alizarínovej červene (zriedte 2,5 ml 1M kyseliny chlorovodíkovej v 100 ml vody a do tohto roztoku pridajte 200 mg alizarínovej červene).

2.1.2.1.3. Preparačné činidlá

- Lúh (NaOH 2,5 % hm./obj. alebo KOH 2,5 % hm./obj.),
- Glycerol (neriedený, viskozita: 1 490 cP) alebo preparačné činidlo s rovnocennými vlastnosťami na prípravu natívneho preparátu,
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskozita: 1 200 cP) alebo živica s rovnocennými vlastnosťami na prípravu trvalého preparátu.

2.1.2.1.4. Preparačné činidlá s vyfarbovacími vlastnosťami

- Lugolov roztok (rozpustíte 2 g jodidu draselného v 100 ml vody a pridajte 1 g jódu za stáleho pretrepávania),
- Cystínové činidlo (2 g octanu olovnatého, 10 g NaOH/100 ml vody),
- Fehlingovo činidlo [pripravuje sa pred použitím z dvoch rovnako veľkých častí (1/1) z dvoch roztokov A a B: roztok A (6,9 g pentahydrátu síranu meďnatého rozpustíte v 100 ml destilovanej vody); roztok B (34,6 g vínanu sodnodraselného tetrahydrátu a 12 g NaOH sa rozpustí v 100 ml destilovanej vody)],
- Tetrametylbenzidín/peroxid vodíka. (1 g 3,3',5,5' tetrametylbenzidínu sa rozpustí v 100 ml ľadovej kyseliny octovej a v 150 ml vody. Pred použitím zmiešajte 4 diely roztoku tetrametylbenzidínu s 1 dielom 3 %-ného peroxidu vodíka).

2.1.2.1.5. Oplachovacie prípravky

- Etanol ≥ 96 % (technický),
- Acetón (technický).

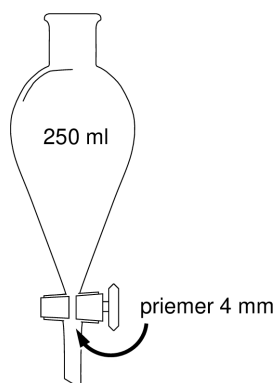
2.1.2.1.6. Bieliaci prostriedok

- Obchodný roztok chlórnanu sodného (9 – 14 % aktívneho chlóru).

▼ **M8**

2.1.2.2. Vybavenie

- Analytická váha s presnosťou 0,001 g,
- Mlecie zariadenie: nôž alebo rotorový mlyn. Ak sa používa rotorový mlyn, nesmú sa v ňom používať sitá s veľkosťou ôk $\leq 0,5$ mm,
- Sitá so štvorcovými okami so šírkou 0,25 mm a 1 mm. S výnimkou predbežného preosievania vzorky nesmie priemer sít presahovať 10 cm, aby sa zabránilo strate materiálu. Kalibračná sít sa nevyžaduje,
- Sklenený kónický oddeľovací lievnik s objemom 250 ml s teflonovým alebo so skleneným zabrúseným uzatváracím kohútikom na spodku kužeľa. Prierez uzatváracieho kohútika v otvorenej polohe je ≥ 4 mm. Alternatívne sa v prípade len jednej sedimentácie TCE môže použiť sklenená kónická sedimentačná kadička, ak laboratórium preukázalo, že hodnoty medznej detekcie zodpovedajú hodnotám získaným pri použití skleneného kónického oddeľovacieho lievika,

*Oddeľovací lievnik*

- Stereoskopický mikroskop umožňujúci konečný rozsah zväčšenia minimálne $6,5\times$ až $40\times$,
- Kombinovaný mikroskop umožňujúci konečný rozsah zväčšenia minimálne $100\times$ až $400\times$ v jasnom poli prechádzajúceho svetla. Ďalej možno použiť polarizované svetlo a diferenciálny interferenčný kontrast,
- Bežné laboratórne sklo,
- Pomôcky na prípravu podložného sklíčka: klasické podložné sklíčka, podložné sklíčka s jamkou, krycie sklíčka (20×20 mm), pinzety, laboratórna špachtlička,
- Laboratórna pec,
- Odstredivka,
- Filtračný papier: kvalitný celulóзовý filter (veľkosť pórov 4 – 11 μm).

2.1.3. *Odber a príprava vzoriek*

2.1.3.1. Odber vzoriek

Používa sa reprezentatívna vzorka odobraná v súlade s prílohou I.

▼M8

2.1.3.1.1. Sušenie vzoriek

Vzorky s obsahom vlhkosti > 14 % sa pred manipuláciou vysušia v súlade s prílohou III.

2.1.3.1.2. Predbežné preosievanie vzoriek

S cieľom zhromaždiť informácie o možnej kontaminácii krmiva z okolitého prostredia sa odporúča vopred preosiať granulované a jadrové krmivo sitom s veľkosťou ôk 1 mm a následne pripraviť, analyzovať a osobitne nahlasovať dve vzniknuté frakcie, ktoré sa musia považovať za samostatné vzorky.

2.1.3.2. Preventívne opatrenia, ktoré sa majú prijať

Všetko vybavenie určené na viacnásobné použitie sa pred použitím dôkladne vyčistí, čím sa zabráni krížovej kontaminácii v laboratóriu. Pred čistením sa oddeľovací lievnik rozoberie na jednotlivé časti. Jednotlivé časti oddeľovacieho lievika a skleneného vybavenia sa vopred umyjú ručne a následne sa vložia do umývacieho zariadenia. Sitá sa čistia kefou s pevnými syntetickými štetinami. Po preosiatí materiálu s obsahom tuku, ako je napr. rybia múčka, sa na záver odporúča očistiť sitá acetónom a stlačeným vzduchom.

2.1.3.3. Príprava vzoriek pozostávajúcich z tukov alebo olejov

Na analýzu vzoriek pozostávajúcich z tukov sa používa tento protokol:

- ak je tuk tuhej konzistencie, ohrieva sa v rúre, kým sa neroztopí,
- použitím pipety sa odoberie 40 ml tuku zo spodnej časti vzorky a prenesie sa do odstredivkovej skúmavky,
- vzorka sa odstredí počas 10 minút pri 4 000 ot/min.,
- ak je tuk po odstredení tuhý, ohrieva sa v rúre, kým sa neroztopí,
- odstredovanie sa opakuje počas 5 minút pri 4 000 ot/min.,
- pomocou laboratórnej lyžičky alebo špachtle sa polovica dekantovaných nečistôt prenesie na mikroskopické podložné sklíčka na preskúmanie. Ako preparačné činidlo sa odporúča glycerol,
- zostávajúce nečistoty sa použijú na prípravu sedimentu, ako je opísané v bode 2.1.3.4.3 v prvej zarážke.

Ten istý protokol, s výnimkou prvej a štvrtej zarážky, sa použije na prípravu vzoriek pozostávajúcich z oleja.

2.1.3.4. Príprava iných vzoriek ako tuky alebo oleje

2.1.3.4.1. Odber podvzoriek a mletie: z aspoň 50 g vzorky sa pripraví podvzorky s cieľom vykonať analýzu a následne sa zomelú.

2.1.3.4.2. Príprava suroviny: pripraví sa dávka aspoň 5 g rozomletej podvzorky. Preoseje sa sitom s veľkosťou ôk 0,25 mm a tieto dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú.

▼ **M8**

- 2.1.3.4.3. Jedna sedimentácia TCE na zisťovanie zložiek živočíšneho pôvodu iných ako suchozemské bezstavovce.

— Extrakcia a príprava sedimentu:

do oddeľovacieho lievika alebo do kónickej sedimentačnej kadičky sa naváži dávka s hmotnosťou 10 g (s presnosťou na 0,01 g) rozomletej podvzorky a pridá sa 50 ml TCE. V prípade rybej múčky alebo iných výrobkov čisto živočíšneho pôvodu, minerálnych zložiek alebo premixov, ktoré vytvárajú viac ako 10 % sedimentu, sa dávka navážená do lievika obmedzí na 3 g. Zmes sa dôkladne pretrepáva počas aspoň 30 s a v priebehu oplachovania vnútorného povrchu oddeľovacieho lievika na účely odstránenia akýchkoľvek priľnutých pevných častíc sa opatrne pridáva ďalších 50 ml TCE. Vzniknutá zmes sa ponechá usadzovať počas aspoň piatich minút, kým sa sediment oddelí otvorením uzatváracieho kohútika.

Ak sa používa kónická sedimentačná kadička, musí sa zmes premiešavať aspoň počas 15 s a všetky pevné častice, ktoré priľnú na stene sedimentačnej kadičky, je nutné z vnútorného povrchu opatrne opláchnuť použitím aspoň 10 ml čistého TCE. Zmes sa ponechá stáť počas troch minút a následne sa opäť premieša počas 15 s a všetky pevné častice, ktoré priľnú na stene sedimentačnej kadičky, je nutné z vnútorného povrchu opatrne opláchnuť použitím aspoň 10 ml čistého TCE. Vzniknutá zmes sa ponechá usadzovať aspoň počas piatich minút a následne sa pomocou dekantácie tekutá frakcia opatrne odstráni a vyleje, pričom sa dbá na to, aby nedošlo k vyliatiu sedimentu.

Sediment sa zachytáva na filtračnom papieri umiestnenom do lievika, aby sa umožnilo oddelenie zostávajúceho TCE a zároveň zabránilo usadzovaniu tuku do sedimentu. Sediment sa vysuší. Odporúča sa následne odvážiť sediment (s presnosťou na 0,001 g) s cieľom kontrolovať krok sedimentácie. Napokon sa sediment preoseje sitom s veľkosťou ôk 0,25 mm a dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú, pokiaľ sa nepovažuje za potrebné ďalšie preosievanie.

— Extrakcia a príprava flotátu:

po odobratí sedimentu podľa uvedenej metódy by v oddeľovacom lieviku mali zostať dve fázy: tekutá, ktorú tvorí TCE, a pevná, vytvorená z plávajúceho materiálu. Pevnou zložkou je flotát, ktorý je nutné odobrať tak, že sa z lievika otvorením uzatváracieho kohútika úplne vypustí TCE. Obrátením oddeľovacieho lievika sa flotát premiestni na veľkú Petriho miskú a vysuší sa vzduchom v laboratórnom digestore. Preoseje sa sitom s veľkosťou ôk 0,25 mm a tieto dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú.

— Použitie vyfarbovacích činidiel:

osoba vykonávajúca analýzu môže na uľahčenie správnej identifikácie zložiek živočíšneho pôvodu použiť pri príprave vzoriek vyfarbovacie činidlá v súlade s pokynmi, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách (EURL-AP).

▼M8

Ak sa na zafarbenie sedimentu použije roztok alizarínovej červene, použije sa tento protokol:

- vysušený sediment sa premiestni do sklenenej skúmavky a dvakrát sa opláchne asi 5 ml etanolu (vždy sa použije počas 30 s magnetické miešadlo, rozpúšťadlo sa nechá usadiť počas 1 min. 30 s a vyleje sa),
- sediment sa vybieli pridaním najmenej 1 ml roztoku hypochloritu sodného. Umožní sa priebeh reakcie počas 10 minút. Skúmavka sa naplní vodou, sediment sa nechá počas dvoch až troch minút usadiť a voda so suspendovanými časticami sa opatrne vyleje,
- sediment sa dvakrát opláchne približne 10 ml destilovanej vody (vždy sa počas 30 s použije magnetické miešadlo, zmes sa nechá usadiť a vyleje sa destilovaná voda),
- pridá sa 2 až 10 kvapiek roztoku alizarínovej červene a zmes sa za použitia magnetického miešadla rozmixuje. Reakcia sa ponechá prebiehať počas 30 s a zafarbený sediment sa dvakrát opláchne asi 5 ml etanolu a následne jedenkrát acetónom (vždy sa počas 30 s použije magnetické miešadlo, rozpúšťadlo sa nechá usadiť – asi 1 min. – a vyleje sa),
- zafarbený sediment sa vysuší.

2.1.3.4.4. Dvojité sedimentácia PE/TCE na zisťovanie zložiek suchozemských bezstavovcov.

Všetky kroky sa vykonávajú v sklenenom kónickom oddeľovacom lieviku s objemom 250 ml, ako je opísané v bode 2.1.2.2 vo štvrtej zarážke.

- Do oddeľovacieho lievika sa naváži dávka s hmotnosťou 10 g (s presnosťou na 0,01 g) rozomletej podvzorky a najprv sa podrobí jednej sedimentácii TCE opísanej v bode 2.1.3.4.3 vrátane odobratia sedimentu na filtračnom papieri umiestnenom na lieviku. Tento sediment sa môže použiť ako sediment získaný z bodu 2.1.3.4.3.
- Malý objem TCE, ktorý vytečie spolu so sedimentom, sa premiestni do odmerného valca. Otvorením uzatváracieho kohútika oddeľovacieho lievika sa odmerný valec ďalej naplní až do získania 30 ml TCE. Keď sa dosiahne tento objem, uzatvárací kohútik sa zatvorí.
- Tento zachytený objem TCE sa nahradí pridaním objemu 30 ml petroléru s teplotou varu 40 – 60 °C do oddeľovacieho lievika. Obsah oddeľovacieho lievika sa dôkladne premieša, aby sa získala zmes 30 % PE/70 % TCE (s hustotou približne 1,26 g.cm⁻³). Materiál sa nechá usadzovať 10 minút. Oddelia sa dve nové frakcie: druhý sediment a konečný flotát (< 1,26 g.cm⁻³). Druhý sediment sa odoberie pomocou Petriho misky (alebo na filtračnom papieri umiestnenom na lieviku) otvorením uzatváracieho kohútika, kým v oddeľovacom lieviku nezostane len troška rozpustenej zmesi a konečný flotát. Zvyšná kvapalina a konečný flotát sa zozbierajú oddelene na filtračnom papieri umiestnenom na lieviku. Stena oddeľovacieho lievika sa opláchne pomocou PE, aby sa zozbieral všetok materiál z konečného flotátu. Konečný flotát sa nechá vysušiť. Konečný flotát sa preoseje sítom s veľkosťou ôk 0,25 mm a dve vzniknuté frakcie sa zanalyzujú na účely zisťovania zložiek suchozemských bezstavovcov, pokiaľ sa nepovažuje za potrebné ďalšie preosievanie.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskopické skúmanie*2.1.4.1. *Príprava podložných sklíčok*

Mikroskopické podložné sklíčka sa pripravujú zo sedimentu a, podľa úvahy osoby vykonávajúcej analýzu, buď z flotátu, alebo zo suroviny. Podľa potreby a len na účely zisťovania zložiek suchozemských bezstavovcov sa podložné sklíčka pripravujú aj z konečného flotátu získaného podľa opisu v bode 2.1.3.4.4. Pripravujú sa dve vzniknuté frakcie (jemná a hrubá). Testovacie dávky frakcií nanosené na podložné sklíčka by mali svojím pomerom zodpovedať celej frakcii.

Na účely uskutočnenia úplného skúšobného protokolu stanoveného v bode 2.1.4.2 sa pripraví dostatočný počet podložných sklíčok.

Mikroskopické podložné sklíčka sa zalejú primeraným preparačným činidlom v súlade so štandardnými operačnými postupmi, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP. Podložné sklíčka sa zakryjú kryciami sklíčkami.

2.1.4.2. *Vývojový diagram pozorovania na účely zisťovania živočíšnych častíc v kŕmnych zmesiach, kŕmnych surovinách a premixoch*

Pripravené mikroskopické podložné sklíčka sa pozorujú v súlade s vývojovými diagramami pozorovania, ktoré sú uvedené v schémach č. 1 a č. 2.

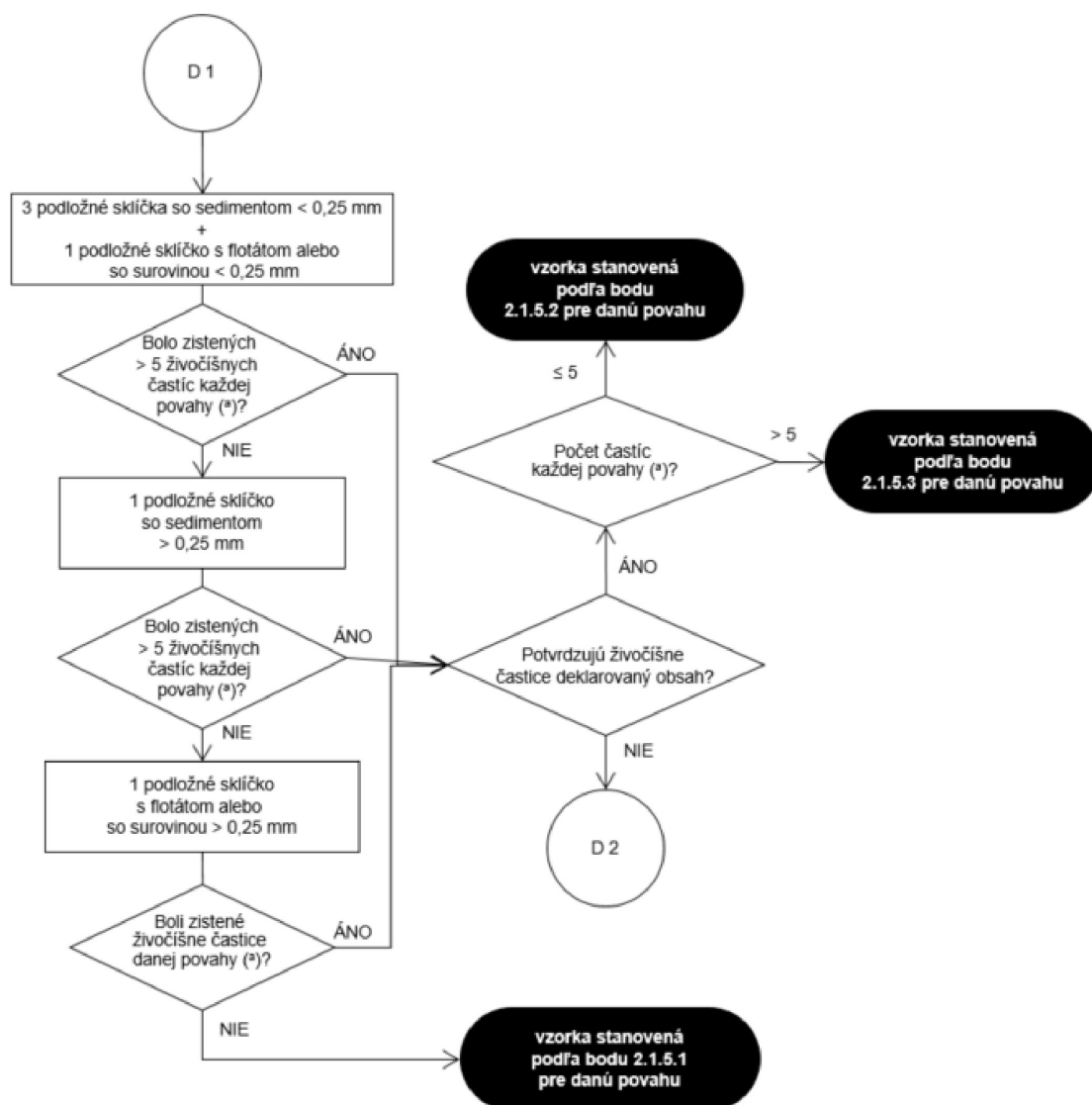
Mikroskopické pozorovania sa uskutočňujú pomocou kombinovaného mikroskopu, pričom sa pozoruje sediment a podľa úvahy osoby vykonávajúcej analýzu buď na flotáte, alebo na surovine. Okrem toho sa na účely zisťovania zložiek suchozemských bezstavovcov vykonávajú pozorovania aj na konečnom flotáte získanom podľa opisu v bode 2.1.3.4.4 v súlade so schémou č. 3. Pre hrubšie frakcie možno okrem kombinovaného mikroskopu použiť aj stereoskopický mikroskop. Celá plocha podložného sklíčka sa preskúma pri rôznom zväčšení. Presné vysvetlenia, ako používať vývojové diagramy, sú podrobne opísané v SOP, ktoré stanovilo a na svojom webovom sídle uverejnilo EURL-AP.

Minimálny počet podložných sklíčok, ktoré sa majú pozorovať, treba dôsledne dodržať v každom kroku vývojového diagramu pozorovania s výnimkou prípadu, keď celý materiál frakcie neumožňuje dosiahnutie stanoveného počtu podložných sklíčok, napríklad ak sa nezíska žiadny sediment. Na zaznamenanie počtu častíc sa použije najviac 6 podložných sklíčok na jednotlivé stanovenia.

V prípade, že sa na flotáte alebo surovine pripravujú ďalšie podložné sklíčka s použitím špecifickejšieho preparačného činidla s vyfarbovacími vlastnosťami, ako sa opisuje v bode 2.1.2.1.4, s cieľom podrobnejšie charakterizovať štruktúry (napr. častice peria, srsti, svalov alebo krvi), ktoré boli zistené na podložných sklíčkach pripravených s použitím iných preparačných činidiel, ako sa opisuje v bode 2.1.2.1.3, počet častíc sa počíta na základe najviac 6 podložných sklíčok na jednotlivé stanovenia vrátane dodatočných podložných sklíčok so špecifickejším preparačným činidlom. Dodatočné podložné sklíčka pripravené z konečného flotátu získaného podľa opisu v bode 2.1.3.4.4 na účely zisťovania zložiek suchozemských bezstavovcov sa nezohľadňujú pri identifikácii iných pováh (suchozemských stavovcov a rýb).

Osoba vykonávajúca pozorovanie môže na účely uľahčenia identifikácie povahy a pôvodu častíc využiť podporné nástroje, ako sú napr. podporné systémy na rozhodovanie, knižnice snímok a referenčné vzorky.

Vývojový diagram pozorovania po jednej sedimentácii TCE na účely zisťovania živočíšnych častíc iných ako zo suchozemských bezstavovcov v kŕmnych zmesiach, kŕmnych surovinách a premixoch pre prvé stanovenie

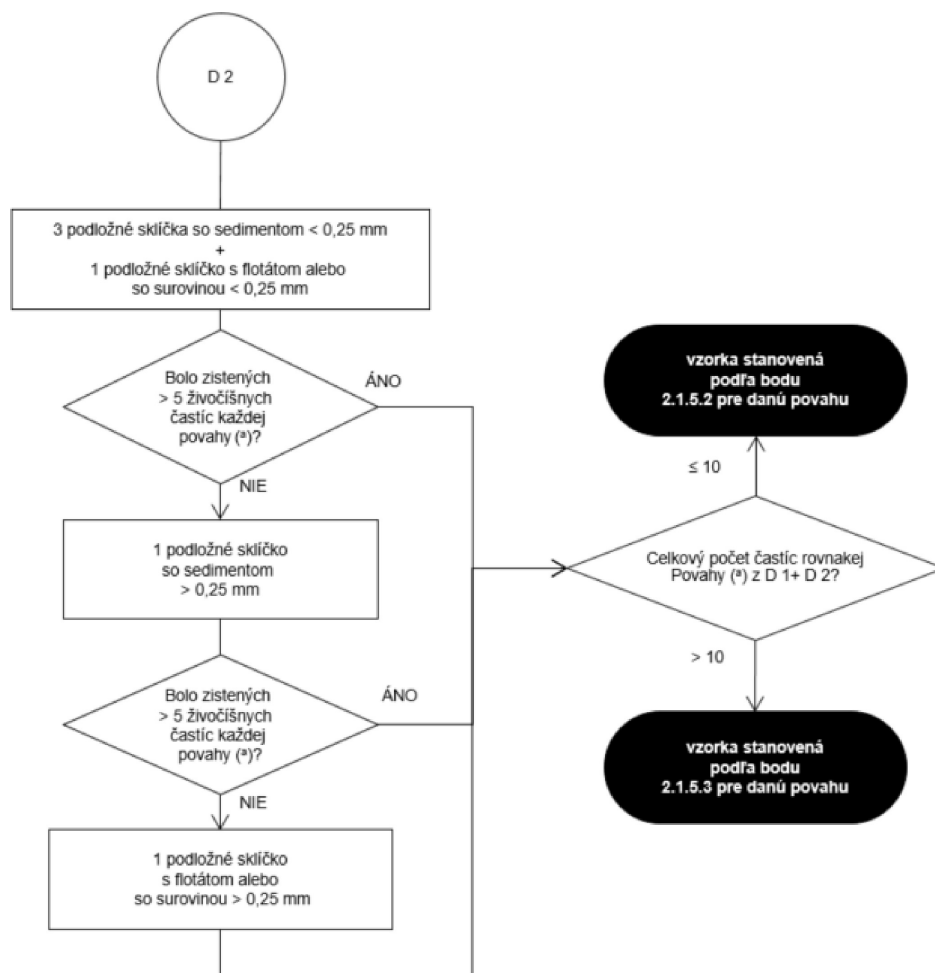


(„D 1“ a „D 2“ znamenajú prvé a druhé stanovenie; (*) : suchozemské stavovce, ryby)

▼M8

Schéma č. 2

Vývojový diagram pozorovania po jednej sedimentácii TCE na účely zisťovania živočíšnych častíc iných ako zo suchozemských bezstavovcov v kŕmnych zmesiach, kŕmnych surovinách a premixoch pre druhé stanovenie

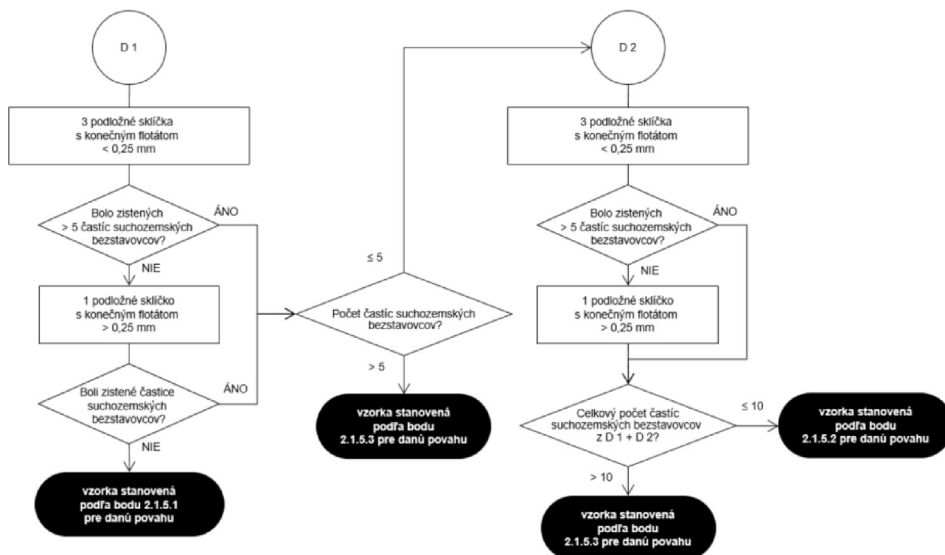


(„D 1“ a „D 2“ znamenajú prvé a druhé stanovenie; (*): suchozemské stavovce, ryby)

▼M8

Schéma č. 3

Vývojový diagram pozorovania po dvojitej sedimentácii PE/TCE na účely zisťovania zložiek suchozemských bezstavovcov v krmných zmesiach, krmných surovinách a premixoch



(„D 1“ a „D 2“ znamenajú prvé a druhé stanovenie)

2.1.4.3. Počet stanovení

Stanovenia sa vykonávajú na rôznych podvzorkách, pričom každá z nich má hmotnosť 50 g.

Ak sa po prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s vývojovým diagramom pozorovania uvedeným v schéme č. 1, alebo podľa potreby v schéme č. 3, nezistili žiadne živočíšne častice, ďalšie stanovenie nie je potrebné a výsledok analýzy sa nahlasuje s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.1.

Ak sa po prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s vývojovým diagramom pozorovania uvedeným v schéme č. 1, zistila jedna alebo viaceré živočíšne častice danej povahy (t. j. suchozemské stavovce alebo ryby) a povaha zistených častíc potvrdí deklarovaný obsah vzorky, druhé stanovenie nie je potrebné. Ak je počet živočíšnych častíc danej povahy zistený počas prvého stanovenia vyšší ako 5, za každú živočíšnu povahu sa nahlasuje výsledok analýzy s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.3. Inak sa výsledok analýzy nahlasuje za každú živočíšnu povahu s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.2.

Ak sa po prvom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s vývojovým diagramom pozorovania uvedeným v schéme č. 3, zistil počet častíc suchozemských bezstavovcov vyšší ako 5, druhé stanovenie nie je potrebné a výsledok analýzy sa nahlasuje s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.3.

▼ **M8**

Vo všetkých ostatných prípadoch vrátane prípadov, keď laboratóriu nebol deklarovaný obsah, sa vykoná druhé stanovenie z novej podvorky. Ak je po druhom stanovení, ktoré sa vykonalo v súlade s vývojovým diagramom pozorovania uvedeným v schéme č. 2, alebo podľa potreby v schéme č. 3, celkový počet živočíšnych častíc danej povahy zistený počas dvoch stanovení vyšší ako 10, za každú živočíšnu povahu sa nahlasuje výsledok analýzy s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.3. Inak sa výsledok analýzy nahlasuje za každú živočíšnu povahu s použitím znenia stanoveného v bode 2.1.5.2.

2.1.5. *Výjadrenie výsledkov*

Pri nahlasovaní výsledkov laboratórium uvedie druh materiálu, na ktorom sa analýza uskutočnila (sediment, flotát, konečný flotát alebo surovina). V správe sa jasne uvedie počet vykonaných stanovení a či sa nevykonalo preosievanie frakcií pred prípravou podložených sklíčok v súlade s bodom 2.1.3.4.3 prvou zarážkou tretím odsekom alebo s bodom 2.1.3.4.4 treťou zarážkou.

Laboratórna správa musí obsahovať aspoň informáciu o prítomnosti zložiek pochádzajúcich zo suchozemských stavovcov a z rýb.

Jednotlivé situácie sa oznamujú takto:

2.1.5.1. Nebola zistená žiadna častica živočíšneho pôvodu danej povahy:

— „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistila žiadna častica pochádzajúca zo suchozemských stavovcov.“

— „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistila žiadna častica pochádzajúca z rýb.“

— „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistila žiadna častica pochádzajúca zo suchozemských bezstavovcov.“

2.1.5.2. V prípade vykonania len jedného stanovenia bolo zistených 1 až 5 živočíšnych častíc danej povahy, alebo v prípade dvoch stanovení bolo zistených 1 až 10 živočíšnych častíc danej povahy [počet zistených častíc je nižší ako rozhodovací limit stanovený v SOP, ktoré stanovilo a na svojom webovom sídle uverejnilo EURL-AP]:

Ak bolo vykonané len jedno stanovenie:

— „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistilo viac ako 5 častíc zo suchozemských stavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kosť, chrupavku, sval, srst', rohovinu, iné (podľa možnosti spresnite)]. Táto nízka miera prítomnosti častíc je pod rozhodovacím limitom stanoveným pre mikroskopickú metódu.“

— „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke nezistilo viac ako 5 častíc z rýb. V prípade zistených častíc išlo o ... [rybie kosti, šupiny, chrupavku, sval, otolit, žiabre, iné (podľa možnosti spresnite)]. Táto nízka miera prítomnosti častíc je pod rozhodovacím limitom stanoveným pre mikroskopickú metódu.“

▼ **M8**

Ak boli vykonané dve stanovenia:

- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení nezistilo viac ako 10 častíc zo suchozemských stavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kosť, chrupavku, sval, srst', rohovinu, iné (podľa možnosti spresnite)]. Táto nízka miera prítomnosti častíc je pod rozhodovacím limitom stanoveným pre mikroskopickú metódu.“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení nezistilo viac ako 10 častíc z rýb. V prípade zistených častíc išlo o ... [rybie kosti, šupiny, chrupavku, sval, otolit, žiabre, iné (podľa možnosti spresnite)]. Táto nízka miera prítomnosti častíc je pod rozhodovacím limitom stanoveným pre mikroskopickú metódu.“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení nezistilo viac ako 10 častíc zo suchozemských bezstavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kutikulárne fragmenty, ústne ústrojenstvo, svaly, tracheálne systémy, iné (podľa možnosti spresnite)]. Táto nízka miera prítomnosti častíc je pod rozhodovacím limitom stanoveným pre mikroskopickú metódu.“

Dodatočne:

- Ak sa použilo predbežné preosievanie vzorky, uvádza sa v laboratórnej správe frakcia (preosiata frakcia, granulovaná frakcia alebo jadrové krmivo), v ktorej boli zistené živočíšne častice, keďže zistenie živočíšnych častíc iba v prípade preosievanej frakcie môže byť ukazovateľom kontaminácie z okolitého prostredia.
- Ak sa zistili len živočíšne častice, ktoré nemožno klasifikovať ani ako suchozemské stavovce, ani ako ryby (napr. svalové vlákna), v správe sa uvedie, že boli zistené len takéto živočíšne častice a že nemožno vylúčiť, že pochádzajú zo suchozemských stavovcov.

2.1.5.3. V prípade vykonania len jedného stanovenia bolo zistených viac ako 5 živočíšnych častíc danej povahy, alebo v prípade dvoch stanovení bolo zistených viac ako 10 živočíšnych častíc danej povahy:

Ak bolo vykonané len jedno stanovenie:

- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke zistilo viac ako 5 častíc zo suchozemských stavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kosť, chrupavku, sval, srst', rohovinu, iné (podľa možnosti spresnite)].“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke zistilo viac ako 5 častíc z rýb. V prípade zistených častíc išlo o ... [rybie kosti, šupiny, chrupavku, sval, otolit, žiabre, iné (podľa možnosti spresnite)].“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke zistilo viac ako 5 častíc zo suchozemských bezstavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kutikulárne fragmenty, ústne ústrojenstvo, svaly, tracheálne systémy, iné (podľa možnosti spresnite)].“

▼ M8

Ak boli vykonané dve stanovenia:

- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení zistilo viac ako 10 častíc zo suchozemských stavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kosť, chrupavku, sval, srst', rohovinu, iné (podľa možnosti spresnite)].“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení zistilo viac ako 10 častíc z rýb. V prípade zistených častíc išlo o ... [rybie kosti, šupiny, chrupavku, sval, otolit, žiabre, iné (podľa možnosti spresnite)].“
- „Na základe skúmania svetelným mikroskopom sa v predloženej vzorke v rámci dvoch stanovení zistilo viac ako 10 častíc zo suchozemských bezstavovcov. V prípade zistených častíc išlo o ... [kutikulárne fragmenty, ústne ústrojenstvo, svaly, tracheálne systémy, iné (podľa možnosti spresnite)].“

Dodatočne:

- Ak sa použilo predbežné preosievanie vzorky, uvádza sa v laboratórnej správe frakcia (preosiata frakcia, granulovaná frakcia alebo jadrové krmivo), v ktorej boli zistené živočíšne častice, keďže zistenie živočíšnych častíc iba v prípade preosievanej frakcie môže byť ukazovateľom kontaminácie z okolitého prostredia.
- Ak sa zistili len živočíšne častice, ktoré nemožno klasifikovať ani ako suchozemské stavovce, ani ako ryby (napr. svalové vlákna), v správe sa uvedie, že boli zistené len takéto živočíšne častice a že nemožno vylúčiť, že pochádzajú zo suchozemských stavovcov.

▼ M2

2.2.

PCR

2.2.1.

Princíp

Fragmenty kyseliny deoxyribonukleovej (DNA) živočíšneho pôvodu, ktoré môžu byť prítomné v krmných surovinách a krmných zmesiach, sa zisťujú prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie pomocou genetickej amplifikácie, ktorá sa zameriava na príslušné sekvencie DNA jednotlivých živočíšnych druhov.

Metóda polymerázovej reťazovej reakcie si vyžaduje fázu extrakcie DNA. Fáza amplifikácie sa používa na takto získaný extrakt DNA s cieľom zistiť živočíšne druhy, na ktoré je skúška zameraná.

2.2.2.

Činidlá a vybavenie

2.2.2.1.

Činidlá

2.2.2.1.1.

Činidlá pre fázu extrakcie DNA

Používajú sa iba činidlá, ktoré schválilo a na svojich internetových stránkach zverejnilo EURL-AP.

2.2.2.1.2.

Činidlá pre fázu genetickej amplifikácie

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Primery a sondy

Použijú sa iba primery a sondy so sekvenciami oligonukleotidov, ktoré validovalo Referenčné laboratórium EÚ pre živočíšne proteíny v krmivách ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Použijú sa iba roztoky Master Mix, ktoré neobsahujú činidlá, ktoré by mohli viesť k nesprávnym výsledkom z dôvodu prítomnosti živočíšnej DNA ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Činidlá pre dekontamináciu

2.2.2.1.2.3.1. Roztok kyseliny chlorovodíkovej (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Bielidlo (roztok hypochloritu sodného s 0,15 % aktívneho chlóru)

2.2.2.1.2.3.3. Činidlá bez žieravých účinkov na dekontamináciu nákladných prístrojov, ako sú napr. analytické váhy (napr. DNA Erase™ od spoločnosti MP Biomedicals)

2.2.2.2. Vybavenie

2.2.2.2.1. Analytická váha s presnosťou 0,001 g

2.2.2.2.2. Mlecie zariadenie

2.2.2.2.3. Termocykler umožňujúci polymerázovú reťazovú reakciu v reálnom čase

2.2.2.2.4. Mikroodstredivka pre skúmavky do mikroodstredivky

2.2.2.2.5. Sada mikropipiet umožňujúcich pipetovanie od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Bežné plastové vybavenie pre molekulárnu biológiu: skúmavky pre mikroodstredivky, plastové špičky mikropipiet s filtrom, misky vhodné pre termocykler.

2.2.2.2.7. Mraziace boxy na uchovávanie vzoriek a činidiel

2.2.3. *Odber a príprava vzoriek*

2.2.3.1. Odber vzoriek

Používa sa reprezentatívna vzorka odobraná podľa postupov stanovených v prílohe I.

2.2.3.2. Príprava vzorky

Príprava laboratórnych vzoriek na extrakciu DNA musí spĺňať požiadavky stanovené v prílohe II. Aspoň 50 g vzorky by sa malo rozdeliť na podvzorky na účely analýzy a následne rozmraziť.

Príprava vzorky prebieha v inej miestnosti ako je miestnosť určená na extrakciu DNA a na reakcie genetickej amplifikácie, ako je stanovené v norme ISO 24276.

Pripravajú sa dve testovacie dávky, každá minimálne s hmotnosťou 100 mg.

2.2.4. *Extrakcia DNA*

Extrakcia DNA sa uskutoční v prípade každej testovacej dávky pripravenej podľa štandardných operačných postupov, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP.

V prípade každej extrakčnej série sa pripravujú dve extrakčné kontrolné vzorky, ako je stanovené v norme ISO 24276.

— jedna extrakčná slepá kontrolná vzorka,

— jedna pozitívna kontrolná vzorka extrakcie DNA.

⁽¹⁾ Zoznam týchto primerov a sond je pre jednotlivé druhy živočíchov k dispozícii na internetových stránkach EURL-AP.

⁽²⁾ Príklady Master Mixov, ktoré možno použiť, sú k dispozícii na internetových stránkach EURL-AP.

▼ **M2**2.2.5. *Genetická amplifikácia*

Genetická amplifikácia sa vykonáva s využitím metód validovaných pre každý druh, ktorý vyžaduje identifikáciu. Tieto metódy sú stanovené v štandardných operačných postupoch, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP. Každý extrakt DNA sa analyzuje aspoň v dvoch rozdielnych riedeniach, aby bolo možné vyhodnotiť inhibíciu.

Pre každý cieľový druh sa pripraví dve kontrolné vzorky amplifikácie, ako je stanovené v norme ISO 24276:

- pozitívna cieľová kontrolná vzorka DNA sa použije pre každú platňu alebo sériu skúšok prostredníctvom PCR,
- kontrola amplifikácie činidla (nazývaná aj negatívna kontrolná vzorka) sa použije pre každú platňu alebo sériu skúšok prostredníctvom PCR.

2.2.6. *Interpretácia a vyjadrenie výsledkov*

Pri nahlasovaní výsledkov uvádza laboratórium minimálne hmotnosť použitých skúšobných dávok, použitý spôsob extrakcie, počet uskutočnených stanovení a medznú hodnotu detekcie danej metódy.

Výsledky sa neinterpretujú a neohlasujú, ak pozitívna kontrolná vzorka extrakcie DNA a pozitívne cieľové kontroly DNA nie sú pre skúmaný cieľ pozitívne a zároveň je kontrola amplifikácie činidla negatívna.

V prípade nezlučiteľných výsledkov z dvoch testovacích dávok sa zopakuje aspoň fáza genetickej amplifikácie. Ak sa laboratórium domnieva, že nezlučiteľnosti by mohli byť zapríčinené extraktmi DNA, pred interpretáciou výsledkov sa uskutoční nová extrakcia DNA a následná genetická amplifikácia.

Konečné vyjadrenie výsledkov je založené na integrácii a interpretácii výsledkov dvoch skúšobných dávok podľa štandardných operačných postupov, ktoré stanovilo a na svojej internetovej stránke zverejnilo EURL-AP.

2.2.6.1. *Negatívny výsledok*

Negatívny výsledok sa oznamuje takto:

V predloženej vzorke nebola zistená žiadna DNA z X (pričom X označuje živočíšny druh alebo skupinu živočíšnych druhov, na ktorý alebo ktorú bola skúška zameraná).

2.2.6.2. *Pozitívny výsledok*

Pozitívny výsledok sa oznamuje takto:

V predloženej vzorke bola zistená DNA z X (pričom X označuje živočíšny druh alebo skupinu živočíšnych druhov, na ktorý alebo ktorú bola skúška zameraná).



PRÍLOHA VII

METÓDA VÝPOČTU ENERGETICKEJ HODNOTY KRMIVA PRE HYDINU

1. Metóda výpočtu a vyjadrenia energetickej hodnoty

Energetická hodnota kŕmnej zmesi pre hydinu sa musí vypočítať v súlade so vzorcom stanoveným nižšie na základe percentuálnych hodnôt určitých analytických zložiek krmiva. Táto hodnota sa vyjadruje v megajouloch (MJ) metabolizovateľnej energie opravenej na dusíkovú rovnováhu (ME) v jednom kilograme kŕmnej zmesi:

$ME \text{ v MJ/kg} = 0,1551 \times \% \text{ dusíkatých látok} + 0,3431 \times \% \text{ tuku} + 0,1669 \times \% \text{ škrobu} + 0,1301 \times \% \text{ celkového cukru (vyjadreného ako sacharóza)}$.

2. Tolerancie uplatniteľné na deklarované hodnoty

Ak úradná kontrola odhalí nezrovnalosť (zvýšená alebo znížená energetická hodnota krmiva) medzi výsledkom kontroly a deklarovanou energetickou hodnotou, bude povolená tolerancia s hodnotou najmenej 0,4 MJ/kg ME.

3. Vyjadrenie výsledkov

Po použití uvedeného vzorca musí byť získaný výsledok udaný na jedno desatinné miesto.

4. Odber vzoriek a analytické metódy

Odber vzoriek z kŕmnej zmesi a stanovenie obsahu analytických zložiek uvedených v metóde výpočtu sa musí vykonať v súlade s metódami Spoločenstva pre odber vzoriek a metódami analýzy na úradnú kontrolu krmív.

Uplatňuje sa nasledujúce:

- na stanovenie obsahu tuku: postup B metódy stanovenia olejov a tukov uvedený v časti H prílohy III,
- na stanovenie obsahu škrobu: polarimetrická metóda uvedená v časti L prílohy III.



PRÍLOHA VIII

**METÓDY ANALÝZY NA KONTROLU NELEGÁLNEJ PRÍTOMNOSTI
DOPLNKOVÝCH LÁTOK, KTORÉ UŽ NIE SÚ POVOLENÉ,
V KRMIVÁCH**

Dôležité poznámky:

Na zistenie nelegálnej prítomnosti doplnkových látok, ktoré už nie sú povolené, v krmivách sa môžu použiť citlivejšie metódy analýzy ako metódy analýzy uvedené v tejto prílohe.

Metódy analýzy uvedené v tejto prílohe sa majú použiť na účely potvrdenia.

A. STANOVENIE METYLBENZOCHÁTU

7-benzyloxy-6-butyl-3-metoxycarbonyl-4-chinolín

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu metylbenzochátu v krmivách. Kvantifikačný limit je 1 mg/kg.

2. Podstata metódy

Metylbenzochát sa extrahuje zo vzorky metanolovým roztokom kyseliny metánsulfónovej. Extrakt sa prečistí dichlórmetánom, s použitím iónovo-výmennej chromatografie a potom znovu dichlórmetánom. Obsah metylbenzochátu sa stanoví pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou (HPLC) a použitím UV detektora.

3. Chemikálie

3.1. Dichlórmetán

3.2. Metanol, čistoty HPLC

3.3. Mobilná fáza HPLC

Zmes metanolu (3.2) a vody (čistoty HPLC) 75 + 25 (v + v).

Prefiltrujte cez 0,22 µm filter (4.5) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút).

3.4. Roztok kyseliny metánsulfónovej c = 2 %

Zriedte 20,0 ml kyseliny metánsulfónovej metanolom na 1 000 ml (3.2).

3.5. Roztok kyseliny chlorovodíkovej, c = 10 %

100 ml kyseliny chlorovodíkovej sa zriedi (ρ₂₀ 1,18 g/ml) vodou na 1 000 ml.

3.6. Katexová živica Amberlite CG 120 (Na), 110 až 200 mešov

Živicu treba pred použitím upraviť: zo 100 g živice sa pripraví suspenzia v 500 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.5) a za stáleho miešania sa privedie do varu zahrievaním na horúcej platni. Nechá sa vychladnúť a kyselina sa dekantuje. Prefiltruje sa cez filtračný papier pod vákuom. Živica sa premyje dvakrát 500 ml dávkami vody a potom 250 ml metanolu (3.2). Živica sa opláchne ďalšou 250 ml dávkou metanolu a vysuší prúdením vzduchu cez filtračný koláč. Vysušená živica sa skladuje v zazátkovanej banke.

3.7. Štandardná látka: čistý metylbenzochát (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolón)

▼B**3.7.1. Zásobný štandardný roztok metylbenzochátu, 500 µg/ml**

S presnosťou na 0,1 mg navážte 50 mg štandardu (3.7), rozpustite v roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) v 100 ml odmernej banke, doplňte po značku a premiešajte.

3.7.2. Pracovný štandardný roztok metylbenzochátu, 50 µg/ml

Do 50 ml odmernej banky napipetujte 5,0 ml zásobného štandardného roztoku metylbenzochátu (3.7.1), doplňte po značku metanolom (3.2) a zamiešajte.

3.7.3. Kalibračné roztoky

Do sady 25 ml odmerných baniek napipetujte 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 ml pracovného štandardného roztoku metylbenzochátu (3.7.2). Doplňte po značku mobilnou fázou (3.3) a zmiešajte. Jednotlivé roztoky majú koncentráciu 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 µg/ml metylbenzochátu. Tieto roztoky sa musia pripraviť čerstvo pred použitím.

4. Prístrojové vybavenie**4.1. Laboratórna trepačka****4.2. Filmová rotačná odparka****4.3. Sklenená kolóna (250 mm × 15 mm) s uzatváracím kohútom a zásobníkom s obsahom približne 200 ml****4.4. HPLC prístroj s ultrafialovým detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s detektorom diódového poľa.****4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu: 300 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈ 10 µm alebo ekvivalentná****4.5. Membránové filtre, 0,22 µm****4.6. Membránové filtre, 0,45 µm****5. Postup****5.1. Všeobecné pokyny****5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva, v ktorej nesmie byť prítomný ani metylbenzochát, ani interferujúce látky.****5.1.2. Vykonaajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo metylbenzochátu, aké sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie úrovne obohatenia 15 mg/kg pridajte 600 µl zásobného štandardného roztoku (3.7.1) do 20 g slepej vzorky, zamiešajte a nechajte stáť 10 min. pred tým, ako budete pokračovať extrakciou (5.2).**

Na účely tejto metódy musí byť slepá vzorka krmiva typovo podobná vzorke skúšanej a pri analýze v nej nesmie byť zistená prítomnosť metylbenzochátu.

5.2. Extrakcia

S presnosťou na 0,01 g navážte približne 20 g pripravenej vzorky a preneste do 250 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 100,0 ml roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) a mechanicky trepte (4.1) 30 minút. Roztok prefiltrujte cez filtračný papier, filtrát zachyťte a použite pri delení kvapalina-kvapalina (5.3).

5.3. Delenie kvapalina-kvapalina

25,0 ml filtrátu získaného podľa (5.2) preneste do 500 ml oddeľovacieho lievika obsahujúceho 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkovej (3.5). Do lievika pridajte 100 ml dichlórmétanu (3.1) a trepte jednu minútu. Vrstvy sa nechajú oddeliť a spodnú vrstvu (dichlórmétán) vypustíte do 500 ml banky s guľatým dnom. Extrakciu vodnej fázy zopakujte s dvomi

▼B

d ďalšími 40 ml dávkami dichlórmetánu a extrakty spojte v banke s guľatým dnom s prvým extraktom. Extrakt dichlórmetánu odparte dosucha na rotačnej odparke (4.2) pracujúcej pri zníženom tlaku pri teplote 40 °C. Zvyšok rozpustite v 20 až 25 ml metanolu (3.2), banku zazátkujte a celé množstvo extraktu odložte na iónovo-výmennú chromatografiu (5.4).

5.4. *Iónovo-výmenná chromatografia*

5.4.1. *Príprava katexovej kolóny*

Do spodnej časti sklenenej kolóny (4.3) vložte zátku zo sklenenej vaty. Pripravte suspenziu z 5,0 g upravenej katexovej živice (3.6) a 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.5), nalejte do sklenenej kolóny a nechajte usadiť. Prebytočnú kyselinu vypustite na úroveň tesne nad povrchom živice a kolónu premývajte vodou, až kým filtrát nebude neutrálny na lakmus. 50 ml metanolu (3.2) naneste na kolónu a nechajte stiecť k povrchu živice.

5.4.2. *Stĺpcová chromatografia*

Pomocou pipety opatrne preneste získaný extrakt (5.3) na kolónu. Banku s guľatým dnom vypláchnite dvoma dávkami 5 až 10 ml metanolu (3.2) a tieto roztoky preneste na kolónu. Extrakt nechajte stiecť k povrchu živice a kolónu premyte 50 ml metanolu tak, aby sa zabezpečilo, že prietoková rýchlosť nepresiahne hodnotu 5 ml za minútu. Vytiekajúci roztok vylejte. Etylbenzochát z kolóny vymývajte 150 ml roztoku kyseliny metánsulfónovej (3.4) a eluát z kolóny zachyťte do 250 ml Erlenmeyrovej banky.

5.5. *Delenie kvapalina-kvapalina*

Eluát získaný podľa (5.4.2) preneste do oddeľovacieho lievika s objemom 1 liter. Erlenmeyerovú banku prepláchnite 5 – 10 ml metanolu (3.2) a roztoky spojte s obsahom oddeľovacieho lievika. Pridajte 300 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.5) a 130 ml dichlórmetánu (3.1). Trepte jednu minútu a fázy oddeľte. Spodnú vrstvu (dichlórmetán) vypustite do 500 ml banky s guľatým dnom. Extrakciu vodnej fázy zopakujte s dvoma ďalšími 70 ml dávkami dichlórmetánu a extrakty spojte v banke s guľatým okrúhlym dnom s prvým extraktom.

Extrakt dichlórmetánu odparte dosucha na rotačnej odparke (4.2) pracujúcej pri zníženom tlaku pri teplote 40 °C. Zvyšok rozpustite v banke s približne 5 ml metanolu (3.2) a tento roztok preneste kvantitatívne do 10 ml odmernej banky. Banku s okrúhlym dnom vypláchnite ďalšími dvoma dávkami 1 až 2 ml metanolu a tieto roztoky preneste do odmernej banky. Doplnite po značku metanolom a zmiešajte. Prefiltrujte alikvotnú časť cez membránový filter (4.6). Tento roztok si nechajte na stanovenie pomocou HPLC (5.6).

5.6. *Stanovenie HPLC*

5.6.1. *Parametre*

Na účel usmernenia sa odporúčajú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu používať za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky:

- kolóna na kvapalinovú chromatografiu (4.4.1),
- mobilná fáza HPLC: zmes metanolu a vody (3.3),
- prietoková rýchlosť: 1 až 1,5 ml/minúta,
- detekčná vlnová dĺžka: 265 nm,
- vstrekový objem: 20 až 50 µl.

▼B

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.7.3) obsahujúci 4 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky alebo plochy píkov a konštantné retenčné časy.

5.6.2. Kalibračná krivka

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkov pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky alebo plochy píkov kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

5.6.3. Roztok vzorky

Niekoľkokrát nastreknite extrakt vzorky (5.5), pričom použite rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch, a stanovte z nameraných výšok (plôch) píkov priemernú výšku (plochu) píku metylbenzochátu.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píkov metylbenzochátu v roztoku vzorky sa porovnaním s kalibračnou krivkou (5.6.2) stanoví koncentrácia roztoku vzorky v µg/ml.

Obsah metylbenzochátu w (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

c = koncentrácia metylbenzochátu v roztoku vzorky v g/ml,

m = hmotnosť navážky vzorky v gramoch.

7. Overenie výsledkov

7.1. Zhodnosť

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.7.3) obsahujúceho 10 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá príslušné množstvo pracovného štandardného roztoku (3.7.2). Množstvo pridaného metylbenzochátu musí byť podobné odhadovanému množstvu metylbenzochátu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku metylbenzochátu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť približne 10 % pôvodnej šírky.

7.1.2. Detekcia detektorom diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorpcie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie s detektorom diódového poľa sa obvyčajne pohybuje okolo 2 nm;

▼B

- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v častiach spektra medzi 220 a 350 nm v rozsahu od 10 až 100 % relatívnej absorbancie. Táto požiadavka je splnená, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorbancie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 220 až 350 nm, v rozsahu 10 až 100 % relatívnej absorbancie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné rovnaké maximá a keď v žiadnom pozorovanom bode odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorbancie spektra vrcholu.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak sa prítomnosť analytu nepotvrdila.

7.2. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť: 10 % relatívnych z vyššieho výsledku pre obsahy metylbenzochátu od 4 a 20 mg/kg.

7.3. *Návratnosť*

V prípade obohatenej slepej vzorky musí byť návratnosť najmenej 90 %.

8. **Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

V 10 laboratóriách sa analyzovalo päť vzoriek. V prípade každej vzorky sa vykonali dvojnásobné analýzy.

	Slepá	Múčka 1	Granule 1	Múčka 2	Granule 2
priemer [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV_R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
návratnosť [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nezistené

s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti, %

s_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %

B. STANOVENIE OLACHINDOXU

2-[N-2'-(hydroxyetyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín- N^1, N^4 -dioxid

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu olachindoxu v krmivách. Kvantifikačný limit je 5 mg/kg.

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje zmesou voda-metanol. Obsah olachindoxu sa stanoví vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s reverznou fázou pomocou UV detektora.

▼ B**3. Chemikálie****3.1. Metanol****3.2. Metanol, čistoty HPLC****3.3. Voda, čistoty HPLC****3.4. Mobilná fáza pre HPLC**

Zmes voda (3.3) – metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)

3.5. Štandardná látka: čistý olachindox 2-[N-2'-(hydroxyethyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín-N¹,N⁴-dioxid, E 851**3.5.1. Zásobný štandardný roztok olachindoxu, 250 µg/ml**

Navážte s presnosťou na 0,1 mg 50 mg olachindoxu (3.5) do odmernej banky a pridajte cca 190 ml vody. Potom banku vložte na 20 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.1). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte vodou po značku a zamiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte v chladničke. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvo každý mesiac.

3.5.2. Pracovný štandardný roztok olachindoxu, 25 µg/ml

Preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.5.1) do 100 ml odmernej banky, doplňte po značku mobilnou fázou (3.4) a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte v chladničke. Tento roztok sa musí pripraviť čerstvo každý deň.

3.5.3. Kalibračné roztoky

Do série 50 ml odmerných baniek preneste 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 a 20,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.5.2). Doplňte po značku mobilnou fázou (3.4) a premiešajte. Banky zabaľte do hliníkovej fólie. Jednotlivé roztoky zodpovedajú 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 a 7,0 µg/ml olachindoxu na ml.

Tieto roztoky sa musia pripraviť čerstvo každý deň.

4. Prístrojové vybavenie**4.1. Ultrazvukový kúpeľ****4.2. Mechanická trepačka****4.3. Zariadenie HPLC s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s detektorom diódového poľa.****4.3.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 250 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 10 µm alebo ekvivalentná****4.4. Membránové filtre, 0,45 µm****5. Postup**

Poznámka: Olachindox je citlivý na svetlo. Všetky procedúry vykonávajte pri tlmenom svetle alebo používajte tmavé laboratórne sklo.

5.1. Všeobecné pokyny**5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva, v ktorom nesmie byť prítomný ani olachindox, ani interferujúce látky.****5.1.2. Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo olachindoxu, aké sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie prídavku 50 mg/kg preneste 10,0 ml zásobného**

▼ B

štandardného roztoku (3.5.1) do 250 ml Erlenmeyerovej banky a nechajte odparovať roztok na približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepej vzorky, dôkladne premiešajte a nechajte 10 minút stáť, potom premiešajte opäť niekoľkokrát pred pristúpením ku kroku extrakcie (5.2).

Poznámka: Na účely tejto metódy musí byť slepá vzorka druhovo podobná analyzovanej vzorke a pri analýze nesmie byť zistený olachindox.

5.2. Extrakcia

S presnosťou na 0,01 g navážte približne 50 g vzorky. Preneste do 1 000 ml Erlenmeyerovej banky, pridajte 100 ml metanolu (3.1) a banku položte do ultrazvukového kúpeľa (4.1). Pridajte 410 ml vody a nechajte v ultrazvukovom kúpeli ďalších 15 min. Vytiahnite banku z ultrazvukového kúpeľa, pretrepte 30 minút v trepačke (4.2) a prefiltrujte cez skladaný filter. Preneste pipetou 10,0 ml filtrátu do 20 ml odmernej banky, doplňte vodou po značku a premiešajte. Prefiltrujte alikvotnú časť cez membránový filter (4.4) (pozri poznámku v bode 9). Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.3).

5.3. Stanovenie HPLC

5.3.1. Parametre:

Na účel usmernenia sa odporúčajú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu používať za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky.

Analytická kolóna (4.3.1)

Mobilná fáza (3.4):	zmes voda (3.3) – metanol (3.2), 900 + 100 (V + V)
Prietoková rýchlosť:	1,5 – 2 ml/min
Vlnová dĺžka pri meraní:	380 nm
Objem nástreku:	20 až – 100 µl.

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.5.3) obsahujúci 2,5 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky pík a konštantné retenčné časy.

5.3.2. Kalibračná krivka

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.5.3) niekoľkokrát a stanovte priemerné výšky (plochy) pík pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky (plochy) pík kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy.

5.3.3. Roztok vzorky

Niekoľkokrát nastreknite extrakt vzorky (5.2), pričom použite rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch a stanovte z nameraných pík priemernú výšku (plochu) píku olachindoxu.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku olachindoxu v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml porovnaním s kalibračnou krivkou (5.3.2).

Obsah olachindoxu w v mg/kg vzorky je daný týmto vzorcom:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼ B

kde:

c = koncentrácia olachindoxu v roztoku vzorky (5.2) v $\mu\text{g/ml}$,
 m = hmotnosť navážky vzorky v g/ml (5.2).

7. Validácia výsledkov

7.1. Zhodnosť

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky (5.2) a kalibračného roztoku (3.5.3) obsahujúceho 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky (5.2) sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.5.3). Množstvo pridaného olachindoxu musí byť podobné množstvu olachindoxu zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku olachindoxu. Šírka píku, v polovici jeho výšky, musí byť v rozpätí $\pm 10\%$ pôvodnej šírky píku olachindoxu neobohateného extraktu vzorky.

7.1.2. Detekcia pomocou detektora diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorpcie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obyčajne pohybuje v rozsahu $\pm 2\text{ nm}$;
- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v časti spektra medzi 220 a 400 nm v rozsahu od 10 až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorbie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 220 a 400 nm v rozsahu 10 až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak sa prítomnosť analytu nepotvrdila.

7.2. Opakovateľnosť

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 15 % relatívnych z vyššieho výsledku pre obsah olachindoxu medzi 10 a 200 mg/kg .

7.3. Návratnosť

V prípade slepej vzorky obohatenej o skúmanú látku musí byť návratnosť najmenej 90 %.

▼B**8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

V rámci spolupráce bola vypracovaná štúdia ES, v ktorej až 13 laboratórií analyzovalo štyri vzorky krmiva pre malé prasiatka vrátane jednej slepej vzorky. Výsledky sú uvedené nižšie:

	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
priemer [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
nominálny obsah [mg/kg]	—	15	50	100
návratnosť %	—	97,3	96,0	95,4

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých hodnôt

S_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti

9. Poznámka

Hoci táto metóda nebola overená pre krmivá obsahujúce viac ako 100 mg/kg olachindoxu, dajú sa dosiahnuť uspokojivé výsledky, ak sa zoberú vzorky s nižšou hmotnosťou a/alebo extrakt (5.2) sa zriedi tak, aby sa dosiahla koncentrácia v rozsahu kalibračnej krivky (5.3.2).

C. STANOVENIE AMPRÓLIA

1-[(4-amino-2-propylpyrimidin-5-yl)metyl]-2-metyl-pyridiniumchlorid hydrochlorid

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah amprólia v krmivách a premixoch. Detekčný limit je 1 mg/kg, limit kvantifikácie je 5 mg/kg.

2. Podstata metódy

Vzorka sa extrahuje zmesou metanol-voda. Po zriedení v mobilnej fáze a membránovej filtrácii sa obsah amprólia stanoví výmenou kationov vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s použitím UV detektora.

3. Chemikálie**3.1. Metanol****3.2. Acetonitril, čistoty HPLC****3.3. Voda, čistoty HPLC****3.4. Roztok dihydro- fosforečnanu sodného, c = 0,1 mol/l**

Rozpusťte 13,80 g monohydrátu dihydrogénfosforečnanu sodného vo vode (3.3) v 1 000 ml kalibrovanej banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.

3.5. Roztok chloristanu sodného, c = 1,6 mol/l

Rozpusťte 224,74 g chloristanu sodného vo vode (3.3) v 1 000 ml odmernej banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.

▼B

3.6. Mobilná fáza pre HPLC (pozri poznámku 9.1)

Zmes acetonitrilu (3.2), roztoku dihydrogénfosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pred použitím prefiltrujte cez 0,22 m membránový filter (4.3) a odplyňte roztok [napr. v ultrazvukovom kúpeli (4.4) aspoň 15 minút].

3.7. Štandardná látka: čisté amprólium, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidín-5-yl)metyl]-2-metylpyridiniumchlorid hydrochlorid, E 750 (pozri 9.2).

3.7.1. Zásobný štandardný roztok amprólia, 500 µg/ml

Navážte s presnosťou 0,1 mg 50 mg amprólia (3.7) do 100 ml odmernej banky, rozpusťte v 80 ml metanolu (3.1) a umiestnite banku na 10 min. do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte vodou po značku a zamiešajte. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.7.2. Pracovný štandardný roztok amprólia, 50 µg/ml

Napipetujte 5,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.7.1) do 50 ml kalibrovanj banky, doplňte extrakčným roztokom po značku (3.8) a zamiešajte. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.7.3. Kalibračné roztoky

Postupne napipetujete 0,5, 1,0 a 2,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.7.2) do 50 ml odmerných baniek. Doplňte po značku mobilnou fázou (3.6) a zmiešajte. Jednotlivé roztoky zodpovedajú 0,5, 1,0 a 2,0 µg amprólia na ml. Tieto roztoky sa musia pripraviť čerstvo pred použitím.

3.8. Extrakčný roztok

Zmes metanol (3.1)-voda 2 + 1 (v + v)

4. Prístrojové vybavenie

4.1. HPLC zariadenie so vstrekovacím systémom vhodné na vstrekovanie objemov 100 µl.

4.1.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 125 mm × 4 mm, s katexovou náplňou Nucleosil 10 SA, 5 alebo 10 µm alebo ekvivalentná

4.1.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s detektorom diódového poľa

4.2. Membránový filter, materiál PTFE, 0,45 µm

4.3. Membránový filter, 0,22 µm

4.4. Ultrazvukový kúpeľ

4.5. Mechanická trepačka alebo magnetická miešačka

5. Postup

5.1. Všeobecné pokyny

5.1.1. Slepá vzorka krmiva

Na uskutočnenie testu návratnosti (5.1.2) sa musí analyzovať slepá vzorka na overenie, či nie je prítomné amprólium alebo interferujúca látka. Zloženie slepej vzorky musí zodpovedať skúmanej vzorke a nesmie sa dokázať prítomnosť amprólia alebo interferujúcej látky.

▼B**5.1.2 Test návratnosti**

Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva, do ktorej bolo pridané obdobné množstvo amprólia, aké sa nachádza vo vzorke. Na dosiahnutie úrovne obohatenia 100 mg/kg preneste 10 ml zásobného štandardného roztoku (3.7.1) do 250 ml Erlenmeyerovej banky a odparte roztok na približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepej vzorky, dôkladne premiešajte a nechajte 10 minút stáť, potom opäť niekoľkokrát premiešajte pred pristúpením ku kroku extrakcie (5.2).

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorky (pozri 5.1.1), test návratnosti sa môže vykonať na základe metódy prídavku štandardu. V tomto prípade sa vzorka, ktorá má byť analyzovaná, obohatí množstvom amprólia, ktoré je podobné tomu, ako sa nachádza vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a návratnosť sa vypočítať odčítaním.

5.2. Extrakcia**5.2.1. Premixy (obsah < 1 % amprólia) a krmivá**

Navážte s presnosťou na 0,01 g 5 – 40 g vzorky v závislosti od obsahu amprólia do 500 ml Erlenmayerovej banky a pridajte 200 ml extrakčného roztoku (3.8). Vložte banku na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Banku vyberte z ultrazvukového kúpeľa a trepte 1 hodinu v trepačke alebo miešajte na magnetickej miešačke (4.5). Zriedte alikvotnú časť extraktu s mobilnou fázou (3.6) na obsah amprólia 0,5 – 2 µg/ml a zamiešajte (pozri poznámku 9.3). Prefiltrujte 5 – 10 ml tohto zriedeného roztoku na membránovom filtri (4.2). Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.3).

5.2.2. Premixy (obsah ≥ 1 % amprólia)

Navážte s presnosťou na 0,001 g 1 – 4 g premixu v závislosti od obsahu amprólia do 500 ml Erlenmayerovej banky a pridajte 200 ml extrakčného roztoku (3.8). Vložte banku na 15 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.4). Banku vyberte z ultrazvukového kúpeľa a pretrepte 1 hodinu v trepačke alebo premiešajte magnetickým miešadlom (4.5). Zriedte alikvotnú časť extraktu s mobilnou fázou (3.6) na obsah amprólia 0,5 – 2 µg/ml a zamiešajte. Prefiltrujte 5 – 10 ml tohto zriedeného roztoku na membránovom filtri (4.2). Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.3).

5.3. Stanovenie HPLC**5.3.1. Parametre:**

Na účel usmernenia sa odporúčajú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu používať za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky.

Kolóna na kvapalinovú

kolóna (4.1.1): 125 mm × 4 mm, s katexovou náplňou Nucleosil 10 SA, 10 µm alebo ekvivalentná

Mobilná fáza (3.6): Zmes acetonitrilu (3.2), roztok dihydrofosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chlóristanu sodného (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Prietoková rýchlosť: 0,7 – 1 ml/min

Vlnová dĺžka pri meraní: 264 nm

Vstrekový objem: 100 µl

▼B

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.7.3) obsahujúci 1,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky pík a konštantné retenčné časy.

5.3.2. Kalibračná krivka

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a stanovte priemerné výšky (plochy) pík pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky pík (plochy) kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

5.3.3. Roztok vzorky

Niekoľkokrát nastreknite extrakt vzorky (5.2), pričom použite rovnaký objem ako pri kalibračných roztokoch a stanovte z nameraných pík priemernú výšku (plochu) píku amprólia.

6. Výpočet výsledkov

Z priemernej výšky (plochy) píku amprólia v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml porovnaním s kalibračnou krivkou (5.3.2).

Obsah amprólia w v mg/kg vzorky je daný týmto vzorcom:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

kde:

V = objem extrakčného roztoku (3.8) v ml podľa 5.2 (t. j. 200 ml),

c = koncentrácia amprólia v extrakte vzorky (5.2) v µg/ml,

f = faktor zriedenia podľa 5.2,

m = hmotnosť navážky vzorky v g.

7. Validácia výsledkov**7.1. Zhodnosť**

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky (5.2) a kalibračného roztoku (3.7.3) obsahujúceho 2,0 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky (5.2) sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.7.3). Množstvo pridaného amprólia musí byť podobné množstvu amprólia zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku amprólia. Šírka píku, v polovici jeho výšky, musí byť v rozpätí $\pm 10\%$ pôvodnej šírky píku amprólia neobohateného extraktu vzorky.

7.1.2. Detekcia pomocou diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorpcie spektra vzorky a spektra štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obvyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm;

▼B

- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v časti spektra medzi 210 a 320 nm v rozsahu od 10 až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorbie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 210 a 320 nm v rozsahu 10 až 100 % relatívnej absorbie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak sa prítomnosť analytu nepotvrdila.

7.2. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke nesmie presiahnuť

- 15 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah amprólia od 25 mg/kg do 500 mg/kg,
- 75 mg/kg pre obsah amprólia medzi 500 mg/kg a 1 000 mg/kg,
- 7,5 % relatívnych z vyššej hodnoty pre obsah amprólia nad 1 000 mg/kg.

7.3. *Návratnosť*

V prípade obohatenej (slepej) vzorky musí byť návratnosť najmenej 90 %.

8. **Výsledky medzilaboratórnej štúdie**

Vykonala sa medzilaboratórna štúdia, v rámci ktorej sa analyzovali krmivá pre hydinu (vzorky 1 – 3), jedno minerálne krmivo (vzorka 4) a jeden premix (vzorka 5). Výsledky sú uvedené v tejto tabuľke

	Vzorka 1 (slepá vzorka krmiva)	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
priemer [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
nominálny obsah [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = počet laboratórií
n = počet jednotlivých hodnôt
s_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti
CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti
s_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti
CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti

▼B**9. Poznámky**

- 9.1. Ak vzorka obsahuje tiamín, pík tiamínu sa objavuje na chromatograme krátko pred píkom amprólia. Amprólium a tiamín sa musia na základe tejto metódy oddeliť. Ak sa amprólium a tiamín neoddeli na kolóne (4.1.1) použitej v tejto metóde, nahraďte až 50 % acetonitrilu v mobilnej fáze (3.6) metanolom.
- 9.2. Podľa britského liekopisu spektrum roztoku amprólia ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) v kyseline chlorovodíkovej ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) vykazuje maximum pri 246 nm a 262 nm. Absorbancia bude 0,84 pri 246 nm a 0,80 pri 262 nm.
- 9.3. Extrakt sa musí vždy zriediť s mobilnou fázou, pretože v opačnom prípade môže retenčný čas kvôli zmenám iónovej sily významne posunúť pík amprólia.

D. STANOVENIE KARBADOXU

Metyl-3-(2-chinoxalinylmetylén)karbazát N^1, N^4 -dioxid

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah karbadoxu v krmivách, premixoch a prípravkoch. Detekčný limit je 1 mg/kg, limit kvantifikácie je 5 mg/kg.

2. Podstata metódy

Vzorka sa upraví vodou a extrahuje zmesou metanol-acetonitril. Pre krmivá sa alikvotná časť filtrovaného extraktu prečistí na kolóne z oxidu hlinitého. V prípade premixov a prípravkov sa alikvotná časť filtrovaného extraktu zriedi na vhodnú koncentráciu vodou, metanolom a acetonitrilom. Obsah karbadoxu sa stanoví vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) s reverznou fázou pomocou UV detektora.

3. Chemikálie

- 3.1. Metanol
- 3.2. Acetonitril, čistoty HPLC
- 3.3. Kyselina octová, $w = 100 \%$
- 3.4. Oxid hlinitý: neutrálny, aktivita I
- 3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 ($v + v$)

Zmiešajte 500 ml metanolu (3.1) s 500 ml acetonitrilu (3.2)

- 3.6. Kyselina octová, $\sigma = 10 \%$
- Zriedte 10 ml octovej kyseliny (3.3) vodou na 100 ml.

- 3.7. Octan sodný

- 3.8. Voda, čistoty HPLC

- 3.9. Octanový tlmivý roztok, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$

Rozpusťte 0,82 g octanu sodného (3.7) v 700 ml vody (3.8) a upravte pH kyselinou octovou (3.6) na 6,0. Preneste do 1 000 ml odmernej banky, doplňte vodou (3.8) po značku a zamiešajte.

- 3.10. Mobilná fáza pre HPLC

Zmiešajte 825 ml octanového tlmivého roztoku (3.9) s 175 ml acetonitrilu (3.2).

Prefiltrujte cez 0,22 μm filter (4,5) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút).

▼B

3.11. Štandardná látka

Čistý karbadox: metyl-3-(2-chinoxalinylmetylén)karbazát N¹,N⁴-dioxid,
E 850

3.11.1. Zásobný štandardný roztok karbadoxu 100 µg/ml
(pozri poznámku v bode 5):

Navážte 25 mg štandardu karbadoxu (3.11) s presnosťou na 0,1 mg do 250 ml odmernej banky. Rozpusťte ultrazvukom (4.7) v metanol-acetonitre (3.5). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte metanol-acetonitriľom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaľte banku hliníkovou fóliou alebo použite nádobu z tmavého skla a uložte do chladničky. Pri teplote $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je roztok stály 1 mesiac.

3.11.2. Kalibračné roztoky

Preneste postupne 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.11.1) do 100 ml odmerných baniek. Pridajte 30 ml vody, doplňte metanol-acetonitriľom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaľte banky hliníkovou fóliou. Jednotlivé roztoky zodpovedajú 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0 µg/ml karbadoxu na ml.

Kalibračné roztoky sa musia pripraviť čerstvo pred použitím.

Poznámka: Na stanovenie karbadoxu v krmivách s obsahom menej ako 10 mg/kg sa musia pripraviť kalibračné roztoky s koncentráciou pod 2,0 µg/ml.

3.12. Zmes voda-[metanol-acetonitril] (3.5), 300 + 700 (v + v)

Zmiešajte 300 ml vody so 700 ml zmesi metanol-acetonitril (3.5).

4. Prístrojové vybavenie

4.1. Laboratórna trepačka alebo magnetická miešačka

4.2. Filtračný papier zo skleneného vlákna (Whatman GF/A alebo ekvivalentný)

4.3. Sklená kolóna (dĺžka 300 až 400 mm, vnútorný priemer asi 10 mm) s fritou zo sintrovaného skla a vypúšťacím ventilom.

Poznámka: Môže sa použiť sklená kolóna s uzatváracím kohútom alebo sklená kolóna so zúženým koncom. V druhom prípade sa do dolného konca vloží malá zátko zo sklenej vaty a utlačí sa pomocou sklenej tyčinky.

4.4. HPLC zariadenie so vstrekovacím systémom vhodné na vstrekovanie objemov 20 µl.

4.4.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu: 300 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 10 µm alebo ekvivalentná

4.4.2. UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo detektor diódového poľa pracujúci v rozsahu 225 až 400 nm

4.5. Membránový filter, 0,22 µm

4.6. Membránový filter, 0,45 µm

4.7. Ultrazvukový kúpeľ

▼B**5. Postup**

Poznámka: Karbadox je citlivý na svetlo. Vykonávajúce všetky činnosti pri tlmenom svetle alebo používajte nádoby z tmavého skla alebo sklené nádoby obalené hliníkovou fóliou.

5.1. Všeobecné pokyny**5.1.1. Slepá vzorka krmiva**

Na uskutočnenie testu návratnosti (5.1.2) sa musí analyzovať slepá vzorka na overenie, či nie je prítomný karbadox alebo interferujúca látka. Zloženie slepej vzorky má zodpovedať skúmanej vzorke a nesmie sa v nej dokázať prítomnosť karbadoxu alebo interferujúcej látky.

5.1.2. Test návratnosti

Vykonajte test návratnosti pomocou analýzy slepej vzorky krmiva (5.1.1), do ktorej bolo pridané podobné množstvo karbadoxu, aké sa nachádza vo vzorke. K pridaniu 50 mg/kg preneste 5,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.11.1) do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Roztok odparte na cca 0,5 ml v prúde dusíka. Pridajte 10 g slepej vzorky, premiešajte a počkajte 10 minút pred extrakciou (5.2).

Ak nie je dostupná slepá vzorka zodpovedajúca zložením skúmanej vzorky (pozri 5.1.1), test návratnosti sa môže vykonať metódou prídavku štandardu. V tomto prípade sa vzorka obohatí množstvom karbadoxu, ktoré je podobné tomu, ktoré sa nachádza vo vzorke. Táto vzorka sa analyzuje spolu s neobohatenou vzorkou a návratnosť sa vypočíta odčítaním.

5.2. Extrakcia**5.2.1. Krmivo**

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 0,01 g a preneste do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 15,0 ml vody, zmiešajte a nechajte 5 minút stáť, kým sa dosiahne rovnováha. Pridajte 35,0 ml metanol-acetonitrilu (3.5), uzatvorte zátkou a 30 minút trepte v trepačke alebo miešajte na magnetickej miešačke (4.1). Roztok prefiltrujte cez filtračný papier so sklenenými vláknami (4.2). Tento roztok si nechajte na prečistenie (5.3).

5.2.2. Premixy (0,1 – 2,0 %)

Navážte 1 g nepomletej vzorky s presnosťou na 0,001 g a preneste do 200 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 15,0 ml vody, zmiešajte a nechajte 5 minút stáť, kým sa dosiahne rovnováha. Pridajte 35,0 ml metanol-acetonitrilu (3.5), uzatvorte zátkou a 30 minút trepte v trepačke alebo miešajte na magnetickej miešačke (4.1). Roztok prefiltrujte cez filtračný papier so sklenenými vláknami (4.2).

Napipetujte alikvotnú časť do 50 ml odmernej banky. Pridajte 15,0 ml vody, doplňte metanol-acetonitriľom (3.5) po značku a zamiešajte. Koncentrácia karbadoxu v konečnom roztoku má byť približne 10 µg/ml. Alikvotná časť sa prefiltruje cez 0,45 µm filter (4.6).

Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.4).

5.2.3. Prípravky (> 2 %)

Navážte 0,2 g nepomletej vzorky s presnosťou na 0,001 g a preneste do 250 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 45,0 ml vody, premiešajte a nechajte 5 min. stáť, kým sa dosiahne rovnováha. Pridajte 105,0 ml

▼B

metanol-acetonitrolu (3.5), zazátkujte a homogenizujte. Vzorku na 15 min. uložte do ultrazvuku (4.7), potom ďalších 15 minút trepte alebo miešajte (4.1). Roztok prefiltrujte cez filtračný papier so sklenenými vláknami (4.2).

Zriedte alikvotnú časť filtrátu so zmesou voda-metanol-acetonitril (3.12) na výslednú koncentráciu karbadoxu 10 – 15 µg/ml (pre 10 % prípravok je zried'ovací faktor 10). Prefiltrujte alikvotnú časť cez 0,45 µm membránový filter (4.6).

Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.4).

5.3. *Prečisťovanie*

5.3.1. *Príprava kolóny s oxidom hlinitým*

Navážte 4 g oxidu hlinitého (3.4) a preneste do sklenej kolóny (4.3).

5.3.2. *Prečistenie vzorky*

Naneste 15 ml prefiltrovaného extraktu (5.2.1) na kolónu s oxidom hlinitým a vylejte prvé 2 ml eluátu. Zachyťte ďalších 5 ml a prefiltrujte alikvotnú časť cez 0,45 µm filter (4.6).

Pokračujte stanovením pomocou HPLC (5.4).

5.4. *Stanovenie HPLC*

5.4.1. *Parametre*

Na účel usmernenia sa odporúčajú nasledujúce podmienky, iné podmienky sa môžu používať za predpokladu, že poskytnú rovnocenné výsledky:

Kolóna na kvapalinovú

kolóna (4.4.1): 300 mm × 4 mm, s náplňou C₁₈, 10 µm alebo ekvivalentná

Mobilná fáza (3.10): Zmes octanového tlmivého roztoku (3.9) a acetonitrilu (3.2), 825 + 175 (v + v)

Prietoková rýchlosť: 1,5 – 2 ml/min

Vlnová dĺžka pri meraní: 365 nm

Vstrekový objem: 20 µ

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.11.2) obsahujúci 5,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky pík (plochy) a konštantné retenčné časy.

5.4.2. *Kalibračná krivka*

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.11.2) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) pík pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky alebo plochy pík kalibračných roztokov ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

5.4.3. *Roztok vzorky*

Vstreknite niekoľkokrát extrakt vzorky [(5.3.2) pre krmivá, (5.2.2) pre premixy a (5.2.3) pre prípravky] a stanovte priemernú výšku píku (plochu) pík karbadoxu.

▼B**6. Výpočet výsledkov**

Z priemernej výšky (plochy) píku karbadoxu v roztoku vzorky stanovte koncentráciu karbadoxu v roztoku vzorky v $\mu\text{g/ml}$ porovnaním s kalibračnou krivkou (5.4.2).

6.1. Krmivo

Obsah karbadoxu w (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

c = koncentrácia karbadoxu v extrakte vzorky (5.3.2) v $\mu\text{g/ml}$,

V_1 = extrakčný objem v ml (t. j. 50),

m = hmotnosť navážky vzorky v g.

6.2. Premixy a prípravky

Obsah karbadoxu w (mg/kg) vzorky je daný týmto vzorcom:

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

kde:

c = koncentrácia karbadoxu v extrakte vzorky (5.2.2 alebo 5.3.2) v $\mu\text{g/ml}$,

V_2 = extrakčný objem v ml (t. j. 50 pre premixy; 150 pre prípravky),

f = faktor zriedenia podľa 5.2.2 (premixy) alebo 5.2.3 (prípravky),

m = hmotnosť navážky vzorky v g.

7. Validácia výsledkov**7.1. Zhodnosť**

Zhodnosť analytu môžeme potvrdiť kochromatografiou alebo použitím detektora diódového poľa, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.11.2) obsahujúceho 10,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Kochromatografia

Do extraktu vzorky sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.11.2). Množstvo pridaného karbadoxu musí byť podobné odhadovanému množstvu karbadoxu zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku karbadoxu. Šírka píku, v polovici jeho maximálnej výšky, musí byť približne v rozpätí $\pm 10\%$ pôvodnej šírky.

7.1.2. Detekcia pomocou diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- a) vlnové dĺžky maximálnej absorpcie spektra vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu musia byť rovnaké s toleranciou určenou rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade detekcie detektorom diódového poľa sa obyčajne pohybuje v rozsahu $\pm 2\text{ nm}$;

▼ B

- b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v časti spektra medzi 225 a 400 nm v rozsahu od 10 až 100 % relatívnej absorbančie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorbančie analytu štandardu;
- c) spektrá vzostupnej časti, vrcholu a zostupnej časti píku vytvorené extraktom vzorky nesmú byť vzájomne odlišné v častiach spektra medzi 225 až 400 nm v rozsahu 10 až 100 % relatívnej absorbančie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorbančie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak sa prítomnosť analytu nepotvrdila.

7.2. Opakovateľnosť

V prípade obsahu 10 mg/kg a viac nesmie rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke presiahnuť 15 % relatívnych z vyššieho výsledku.

7.3. Návratnosť

V prípade obohatenej (slepej) vzorky má byť návratnosť najmenej 90 %.

8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie

Vykonala sa medzilaboratórna štúdia, v rámci ktorej 8 laboratórií analyzovalo 6 krmív, 4 premixy a 3 prípravky. Každá vzorka sa analyzovala dvakrát. (Podrobnejšie informácie o tejto medzilaboratórnej štúdii možno nájsť v *Úradnom vestníku AOAC, zväzok 71, 1988, s. 484 – 490*). Výsledky (okrem odľahlých hodnôt) sú uvedené nižšie:

Tabuľka 1

Výsledky medzilaboratórnej štúdie pre krmivá

	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3	Vzorka 4	Vzorka 5	Vzorka 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
priemer (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S _r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV _r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S _R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV _R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
nominálny obsah (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabuľka 2

Výsledky medzilaboratórnej štúdie pre premixy a prípravky

	Premixy				Prípravky		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
priemer (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S _r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S _R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Premixy				Prípravky		
	A	B	C	D	A	B	C
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
nominálny obsah (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých hodnôt

S_r = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

CV_r = variačný koeficient opakovateľnosti

S_R = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV_R = variačný koeficient reprodukovateľnosti



PRÍLOHA IX

TABUĽKY ZHODY UVEDENÉ V ČLÁNKU 6

1. Smernica 71/250/EHS

Smernica 71/250/EHS	Toto nariadenie
Článok 1 prvý pododsek	Článok 3
Článok 1 druhý pododsek	Článok 2
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha časť 1	Príloha II
Príloha časť 2	—
Príloha časť 3	—
Príloha časť 4	Príloha III časť O
Príloha časť 5	Príloha III časť M
Príloha časť 6	Príloha III časť N
Príloha časť 7	Príloha III časť Q
Príloha časť 9	Príloha III časť K
Príloha časť 10	—
Príloha časť 11	—
Príloha časť 12	Príloha III časť J
Príloha časť 14	Príloha III časť D
Príloha časť 16	—

2. Smernica 71/393/EHS

Smernica 71/393/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha časť I	Príloha III časť A
Príloha časť II	Príloha III časť E
Príloha časť III	Príloha III časť P
Príloha časť IV	Príloha III časť H

3. Smernica 72/199/EHS

Smernica 72/199/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Príloha I časť 1	Príloha III časť L
Príloha I časť 2	Príloha III časť C
Príloha I časť 3	—
Príloha I časť 4	—
Príloha I časť 5	Príloha V časť A
Príloha II	—

4. Smernica 73/46/EHS

Smernica 73/46/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 3	—
Článok 4	—
Príloha I časť 1	Príloha III časť B
Príloha I časť 2	—
Príloha I časť 3	Príloha III časť I

▼B**5. Smernica 76/371/EHS**

Smernica 76/371/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 1
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	Príloha I

6. Smernica 76/372/EHS

Smernica 76/372/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	—
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	—

7. Smernica 78/633/EHS

Smernica 78/633/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha časť 1	—
Príloha časť 2	—
Príloha časť 3	Príloha IV časť C

8. Smernica 81/715/EHS

Smernica 81/715/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	—
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	—

9. Smernica 84/425/EHS

Smernica 84/425/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	—
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	—

10. Smernica 86/174/EHS

Smernica 86/174/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 4
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	Príloha VII

11. Smernica 93/70/EHS

Smernica 93/70/EHS	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha	Príloha IV časť D

▼B**12. Smernica 93/117/ES**

Smernica 93/117/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Články 3 a 5
Článok 2	—
Článok 3	—
Príloha časť 1	Príloha IV časť E
Príloha časť 2	Príloha VIII časť A

13. Smernica 98/64/ES

Smernica 98/64/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Články 3 a 5
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Príloha časť A	Príloha III časť F
Príloha časť C	Príloha VIII časť B

14. Smernica 1999/27/ES

Smernica 1999/27/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Články 3 a 5
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Článok 5	—
Článok 6	—
Článok 7	—
Príloha časť A	Príloha VIII časť C
Príloha časť B	Príloha IV časť F
Príloha časť C	Príloha VIII časť D

15. Smernica 1999/76/ES

Smernica 1999/76/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Príloha	Príloha IV časť G

16. Smernica 2000/45/ES

Smernica 2000/45/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Príloha časť A	Príloha IV časť A
Príloha časť B	Príloha IV časť B
Príloha časť C	Príloha III časť G

▼B**17. Smernica 2002/70/ES**

Smernica 2002/70/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 1
Článok 2	Články 2 a 3
Článok 3	—
Článok 4	—
Článok 5	—
Príloha I	Príloha I a príloha V časť B (I)
Príloha II	Príloha II a príloha V časť B (II)

18. Smernica 2003/126/ES

Smernica 2003/126/ES	Toto nariadenie
Článok 1	Článok 3
Článok 2	—
Článok 3	—
Článok 4	—
Článok 5	—
Článok 6	—
Príloha	Príloha VI