

# Úradný vestník

# L 54

## Európskej únie



Slovenské vydanie

### Právne predpisy

Zväzok 52

26. februára 2009

Obsah

I Akty prijaté podľa Zmluvy o ES/Zmluvy o Euratome, ktorých uverejnenie je povinné

NARIADENIA

- ★ **Nariadenie Komisie (ES) č. 152/2009 z 27. januára 2009, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na účely úradných kontrol krmív <sup>(1)</sup> .....** 1

**Poznámka pre čitateľa** (pozri vnútornú stranu zadnej obálky)

Cena: 26 EUR

<sup>(1)</sup> Text s významom pre EHP

# SK

Akty, ktoré sú vytlačené obyčajným písmom, sa týkajú každodennej organizácie poľnohospodárskych záležitostí a sú spravidla platné len obmedzený čas.

Názvy všetkých ostatných aktov sú vytlačené tučným písmom a je pred nimi hviezdička.

## I

(Akty prijaté podľa Zmluvy o ES/Zmluvy o Euratome, ktorých uverejnenie je povinné)

## NARIADENIA

## 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)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva a predpisov o zdraví zvierat a o starostlivosti o zvieratá <sup>(1)</sup>, a najmä na jeho článok 11 ods. 4 písm. a), b) a c),

keďže:

(1) Na implementáciu smernice 70/373/EHS boli prijaté tieto akty, ktoré zostávajú v platnosti v súlade s článkom 61 ods. 2 nariadenia (ES) č. 882/2004:

- prvá smernica Komisie 71/250/EHS z 15. júna 1971, ktorou sa stanovujú analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(2)</sup>,
- druhá smernica Komisie 71/393/EHS z 18. novembra 1971, ustanovujúca metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív v Spoločenstve <sup>(3)</sup>,
- tretia smernica Komisie 72/199/EHS z 27. apríla 1972 stanovujúca analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(4)</sup>,

— štvrtá smernica Komisie 73/46/EHS z 5. decembra 1972, ktorou sa ustanovujú analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(5)</sup>,

— prvá smernica Komisie 76/371/EHS z 1. marca 1976, ktorou sa určujú metódy Spoločenstva pre odber vzoriek na úradnú kontrolu krmív <sup>(6)</sup>,

— siedma smernica Komisie 76/372/EHS z 1. marca 1976, ktorá ustanovuje analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(7)</sup>,

— ôsma smernica Komisie 78/633/EHS z 15. júna 1978, ktorou sa stanovujú analytické metódy Spoločenstva pre potreby úradnej kontroly krmív <sup>(8)</sup>,

— deväta smernica Komisie 81/715/EHS z 31. júla 1981, ktorá ustanovuje metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív v Spoločenstve <sup>(9)</sup>,

— desiatu smernicu Komisie 84/425/EHS z 25. júla 1984, ktorá stanovuje metódy analýzy pri úradnej kontrole krmív v Spoločenstve <sup>(10)</sup>,

— smernicu Komisie 86/174/EHS z 9. apríla 1986, ktorá stanovuje metódu výpočtu energetickej hodnoty krmivej zmesi pre hydinu <sup>(11)</sup>,

<sup>(1)</sup> Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

<sup>(2)</sup> Ú. v. ES L 155, 12.7.1971, s. 13.

<sup>(3)</sup> Ú. v. ES L 279, 20.12.1971, s. 7.

<sup>(4)</sup> Ú. v. ES L 123, 29.5.1972, s. 6.

<sup>(5)</sup> Ú. v. ES L 83, 30.3.1973, s. 21.

<sup>(6)</sup> Ú. v. ES L 102, 15.4.1976, s. 1.

<sup>(7)</sup> Ú. v. ES L 102, 15.4.1976, s. 8.

<sup>(8)</sup> Ú. v. ES L 206, 29.7.1978, s. 43.

<sup>(9)</sup> Ú. v. ES L 257, 10.9.1981, s. 38.

<sup>(10)</sup> Ú. v. ES L 238, 6.9.1984, s. 34.

<sup>(11)</sup> Ú. v. ES L 130, 16.5.1986, s. 53.

— jedenásta Smernica Komisie 93/70/EHS z 28. júla 1993, ktorou sa určujú metódy analýzy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(1)</sup>,

— dvanásta smernica Komisie 93/117/ES zo 17. decembra 1993, ktorou sa stanovujú analytické metódy Spoločenstva na úradnú kontrolu krmív <sup>(2)</sup>,

— smernica Komisie 98/64/ES z 3. septembra 1998, ktorou sa ustanovujú analytické metódy Spoločenstva na stanovenie aminokyselín, olejov a tukov a olaquinoxu v krmivách a ktorou sa mení a dopĺňa smernica 71/393/EHS <sup>(3)</sup>,

— smernica Komisie č. 1999/27/ES z 20. apríla 1999, ktorou sa zavádzajú analytické metódy Spoločenstva na stanovenie amprólia, diklazurilu a karbadoxu v krmivách a ktorá mení a dopĺňa smernice 71/250/EHS, 73/46/EHS a zrušuje smernica 74/203/EHS <sup>(4)</sup>,

— smernica Komisie 1999/76/ES z 23. júla 1999 stanovujúca analytickú metódu Spoločenstva pre stanovenie lasalocidu sodného v krmivách <sup>(5)</sup>,

— smernica Komisie 2000/45/ES zo 6. júla 2000, ktorou sa ustanovujú analytické metódy Spoločenstva na stanovenie vitamínu A, vitamínu E a tryptofánu v krmivách <sup>(6)</sup>,

— smernica Komisie 2002/70/ES z 26. júla 2002, ktorou sa zavádzajú požiadavky na určovanie koncentrácie dioxínov a PCB podobných dioxínom v krmivách <sup>(7)</sup>,

— smernica Komisie 2003/126/ES z 23. decembra 2003 o analytickej metóde na stanovenie zložiek živočíšneho pôvodu na úradnú kontrolu krmiva <sup>(8)</sup>.

(2) Keďže smernica 70/373/EHS bola nahradená nariadením (ES) č. 882/2004, je vhodné nahradiť vykonávacie predpisy k tejto smernici jediným nariadením. Zároveň by sa metódy mali prispôsobiť vývoju vedeckých a technických poznatkov. Metódy, ktoré už nie sú platné pre svoj plánovaný účel, by sa mali vypustiť. Očakáva sa aktualizácia ustanovení o odbere vzoriek v plánovanom čase, pri ktorej sa zohľadní súčasný vývoj v spôsobe výroby, skladovania, prepravy a uvádzania krmiva na trh, napriek tomu je však vhodné dovtedy zachovať súčasné predpisy týkajúce sa odberu vzoriek.

(3) 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 by sa preto mali zrušiť.

(4) Opatrenia ustanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

#### Článok 1

Odber vzoriek na účely úradných kontrol krmív, pokiaľ ide o stanovenie zložiek, doplnkových látok a nežiaducich látok s výnimkou rezíduí pesticídov a mikroorganizmov, sa vykonáva v súlade s metódami stanovenými v prílohe I.

#### 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.

#### 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.

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES L 234, 17.9.1993, s. 17.

<sup>(2)</sup> Ú. v. ES L 329, 30.12.1993, s. 54.

<sup>(3)</sup> Ú. v. ES L 257, 19.9.1998, s. 14.

<sup>(4)</sup> Ú. v. ES L 118, 6.5.1999, s. 36.

<sup>(5)</sup> Ú. v. ES L 207, 6.8.1999, s. 13.

<sup>(6)</sup> Ú. v. ES L 174, 13.7.2000, s. 32.

<sup>(7)</sup> Ú. v. ES L 209, 6.8.2002, s. 15.

<sup>(8)</sup> Ú. v. EÚ L 339, 24.12.2003, s. 78.

*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.

V Bruseli 27. januára 2009

*Za Komisiu*  
Androulla VASSILIOU  
*členka Komisie*

---

## PRÍLOHA I

## METÓDY ODBERU VZORIEK

## 1. ÚČEL A ROZSAH

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

## 2. PRACOVNÍCI ODOBERAJÚCI VZORKY

Vzorky odoberajú pracovníci poverení členskými štátmi na tento účel.

## 3. VYMEDZENIE POJMOV

Vzorkovaná partia: množstvo výrobku tvoriace celok a majúce charakteristické znaky, na základe ktorých sa predpokladá, že má homogénne zloženie.

Čiastková vzorka: množstvo odobraté z jedného miesta vzorkovanej partie.

Súhrnná vzorka: súhrn všetkých čiastkových vzoriek odobratých z tej istej vzorkovanej partie.

Zredukovaná vzorka: reprezentatívna časť súhrnnej vzorky získaná jej delením.

Konečná vzorka: časť zredukovanej vzorky alebo zhomogenizovanej súhrnnej vzorky.

## 4. VZORKOVACIE POMÔCKY

4.1. Pomôcky na odber vzoriek musia byť vyrobené z materiálov, ktoré nemôžu kontaminovať výrobky určené na odber vzoriek. Toto vybavenie môže byť úradne schválené členskými štátmi.

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.

4.2.2. *Mechanický odber vzoriek*

Schválené mechanické vybavenie sa môže používať na odber vzoriek z pohybujúceho sa krmíva.

4.2.3. *Delič vzorky*

Vybavenie určené na rozdelenie vzorky na približne rovnaké časti sa môže použiť pri odbere čiastkových vzoriek a na prípravu zredukovanej a konečnej vzorky.

## 5. KVANTITATÍVNE POŽIADAVKY

5.A.	V súvislosti s kontrolou látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmive
5.A.1.	<b>Vzorkovaná partia</b> Veľkosť vzorkovanej partie musí byť taká, aby v odobratej vzorke bola prítomná každá zložka krmíva.

5.A.2.	<b>Čiastkové vzorky</b>	
5.A.2.1.	Voľne ložené krmivá:	Minimálny počet čiastkových vzoriek:
5.A.2.1.1.	Vzorkované partie, ktorých hmotnosť nepresahuje 2,5 metrických ton	Sedem
5.A.2.1.2.	Vzorkované partie, ktorých hmotnosť presahuje 2,5 metrických ton	$\sqrt{20}$ násobok počtu metrických ton, ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (*), pričom najvyšší počet čiastkových vzoriek je 40
5.A.2.2.	Balené krmivá:	Minimálny počet balení, z ktorých sa má odobrať vzorka (**):
5.A.2.2.1.	Balenia s hmotnosťou viac ako jeden kilogram:	
5.A.2.2.1.1.	Vzorkované partie s počtom jedno až štyri balenia	Všetky balenia
5.A.2.2.1.2.	Vzorkované partie s počtom päť až 16 balení	Štyri
5.A.2.2.1.3.	Vzorkované partie s počtom viac ako 16 balení	$\sqrt{\text{počet balení}}$ , ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (*), pričom najvyšší počet balení je 20
5.A.2.2.2.	Balenia s hmotnosťou do 1 kg	Štyri
5.A.2.3.	Tekuté alebo polotekuté krmivá:	Minimálny počet nádob, z ktorých sa má odobrať vzorka (**):
5.A.2.3.1.	Nádoby s objemom viac ako jeden liter:	
5.A.2.3.1.1.	Vzorkované partie s počtom jedna až štyri nádoby	Všetky nádoby
5.A.2.3.1.2.	Vzorkované partie s počtom päť až 16 nádob	Štyri
5.A.2.3.1.3.	Vzorkované partie s počtom viac ako 16 nádob	$\sqrt{\text{počet nádob}}$ , ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (*), pričom najvyšší počet nádob je 20
5.A.2.3.2.	Nádoby s objemom nepresahujúcim jeden liter	Štyri
5.A.2.4.	Bloky krmiva a minerálne lizy	Minimálny počet blokov alebo lizov, z ktorých sa má odobrať vzorka (**): Jeden blok alebo jeden liz na vzorkovanú partiu s počtom 25 jednotiek, najviac však štyri bloky alebo štyri lizy
5.A.3.	<b>Súhrnná vzorka</b> Vyžaduje sa jedna súhrnná vzorka na vzorkovanú partiu. Celkové množstvo čiastkových vzoriek, ktoré tvorí súhrnnú vzorku, predstavuje najmenej:	
5.A.3.1.	Voľne ložené krmivá	4 kg
5.A.3.2.	Balené krmivá:	
5.A.3.2.1.	Balenia s hmotnosťou viac ako 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	Balenia, ktorých hmotnosť nepresahuje 1 kg	Hmotnosť obsahu štyroch pôvodných balení
5.A.3.3.	Tekuté alebo polotekuté krmivá:	
5.A.3.3.1.	Nádoby s objemom viac ako jeden liter	Štyri litre
5.A.3.3.2.	Nádoby, ktorých objem nepresahuje jeden liter	Objem obsahu štyroch pôvodných nádob
5.A.3.4.	Bloky krmiva a minerálne lizy:	
5.A.3.4.1.	Každý s hmotnosťou viac ako 1 kg	4 kg
5.A.3.4.2.	Každý s hmotnosťou do 1 kg	Hmotnosť štyroch pôvodných blokov alebo lizov

5.A.4.	<b>Konečné vzorky</b> V prípade potreby sa konečné vzorky získajú redukciou súhrnnej 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
5.B.	V súvislosti s kontrolou nežiaducich látok alebo produktov, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v krmive, napr. aflatoxínov, ražného námelu, ricínu a krotónu v kŕmnej surovine (***)	
5.B.1.	<b>Vzorkovaná partia:</b> pozri 5.A.1.	
5.B.2.	<b>Čiastkové vzorky</b>	
5.B.2.1.	Voľne krmivá: pozri 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Balené krmivá:	Minimálny počet balení, z ktorých sa majú odobrať vzorky:
5.B.2.2.1.	Vzorkované partie pozostávajúce z jedného až štyroch balení	Všetky balenia
5.B.2.2.2.	Vzorkované partie pozostávajúce z piatich až 16 balení	Štyri
5.B.2.2.3.	Vzorkované partie pozostávajúce z viac ako 16 balení	√ počet balení, ktoré predstavujú vzorkovanú partiu (*), pričom najvyšší počet balení je 40
5.B.3.	<b>Súhrnné vzorky</b> Počet súhrnných vzoriek závisí od veľkosti vzorkovanej partie. Minimálny počet súhrnných vzoriek na vzorkovanú partiu je uvedený nižšie. Celková hmotnosť čiastkových vzoriek, ktoré tvoria súhrnnú vzorku, predstavuje najmenej 4 kg na každú súhrnnú vzorku.	
5.B.3.1.	Voľne ložené krmivá	
	Hmotnosť vzorkovanej partie v metrických tonách:	Minimálny počet súhrnných vzoriek na vzorkovanú partiu:
	najviac 1	1
	viac ako 1 až do 10	2
	viac ako 10 až do 40	3
	nad 40	4
5.B.3.2.	Veľkosť vzorkovanej partie baleného krmiva vyjadrená počtom balení:	Minimálny počet súhrnných vzoriek na vzorkovanú partiu:
	1 až 16	1
	17 až 200	2
	201 až 800	3
	viac ako 800	4
5.B.4.	<b>Konečné vzorky</b> Z každej súhrnnej vzorky sa redukciou získavajú konečné vzorky. Vyžaduje sa analýza aspoň jednej konečnej vzorky na jednu súhrnnú vzorku. Hmotnosť konečnej vzorky na analýzu nesmie byť nižšia ako 500 g.	

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

(\*\*) V prípade balení alebo nádob, ktorých obsah každého(-ej) nepresahuje 1 kilogram alebo 1 liter a v prípade blokov alebo lizov, z ktorých každý neváži viac ako 1 kg, čiastkovú vzorku tvorí obsah jedného pôvodného balenia alebo nádoby, jeden blok alebo jeden liz.

(\*\*\*) Metódy stanovené v bode 5.A sa uplatňujú na kontrolu aflatoxínov, ražného námelu, ricínu a krotónu v kompletnom alebo doplnkovom krmive.

6. POKYNY PRE ODBER, PRÍPRAVU A BALENIE VZORIEK

6.1. **Všeobecné pokyny**

Vzorky sa musia odobrať a pripraviť čo najrýchlejšie s ohľadom na preventívne opatrenia, ktoré sú potrebné na zabezpečenie toho, aby nedošlo k zámene alebo ku kontaminácii produktu. Nástroje, ako aj plochy a nádoby určené na príjem vzoriek musia byť čisté a suché.

6.2. **Čiastkové vzorky**

6.2.A. *V súvislosti s kontrolou látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmive*

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

6.2.A.1. *Voľne ložené krmivá*

Vzorkovaná partia sa imaginárne rozdelí na určitý počet približne rovnakých častí. Počet častí zodpovedajúci počtu čiastkových vzoriek požadovanému v súlade s bodom 5.A.2 sa vyberá náhodne a z každej z týchto častí sa odoberá aspoň jedna vzorka.

V prípade potreby odber vzorky môže byť vykonaný počas pohybu vzorkovanej partie (nakladanie alebo vykladanie).

6.2.A.2. *Balené krmivo*

Po výbere požadovaného množstva balení na odber vzoriek podľa bodu 5.A.2 sa časť obsahu každého balenia odoberá pomocou tyče alebo lopaty. V prípade potreby sa vzorky odoberú jednotlivo po vyprázdnení balení. Hrudky sa v každej súhrnnej vzorke rozbijú; v prípade potreby sa hrudky rozbijú oddelene a potom sa vrátia do vzorky.

6.2.A.3. *Homogénne alebo homogenizovateľné tekuté alebo polotekuté krmivá*

Po výbere požadovaného počtu nádob na odber vzoriek podľa bodu 5.A.2 sa obsah v prípade potreby homogenizuje a z každej nádoby sa odoberie určité množstvo.

Čiastkové vzorky môžu byť odobraté počas vyprázdňovania obsahu nádoby.

6.2.A.4. *Nehomogenizovateľné, tekuté alebo polotekuté krmivá*

Po výbere požadovaného počtu nádob na odber vzoriek podľa bodu 5.A.2 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.

6.2.A.5. *Bloky krmiva a minerálne lizy*

Po výbere požadovaného počtu blokov alebo lizov na odber vzoriek podľa bodu 5.A.2 sa odoberie časť z každého bloku alebo lizu.

6.2.B. *V súvislosti s kontrolou nežiaducich látok alebo produktov, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v krmive, napr. aflatoxínov, ražného námelu, ricínu a krotónu v krmných surovinách.*

Vzorkovaná partia sa imaginárne rozdelí na určitý počet približne rovnakých častí zodpovedajúci počtu súhrnných vzoriek uvedenému v bode 5.B.3. Ak tento počet je väčší než 1, celkový počet čiastkových vzoriek uvedený v bode 5.B.2 sa rozloží približne rovnako v jednotlivých častiach. Potom sa odoberú približne rovnako veľké vzorky <sup>(1)</sup> tak, aby celkové množstvo vo vzorkách z každej časti malo hmotnosť aspoň 4 kg požadovanú pre každú súhrnnú vzorku. Čiastkové vzorky odobraté z rozdielnych častí sa nespájajú.

<sup>(1)</sup> Pri balených krmivách sa odstráni časť obsahu balení, z ktorých sa majú odobrať vzorky použitím tyče alebo lopaty po tom, ako sa v prípade potreby balenia jednotlivo vyprázdnia.



**6.3. Príprava súhrnných vzoriek****6.3.A. V súvislosti s kontrolou látok alebo produktov rovnomerne rozložených v krmive**

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

**6.3.B. V súvislosti s kontrolou nežiaducich látok alebo produktov, ktoré by mohli byť nerovnomerne rozložené v krmive, napr. aflatoxínov, ražného námelu, ricínu a krotónu v kŕmnych surovinách**

Čiastkové vzorky z každej časti vzorkovanej partie sa zmiešajú a vytvoria sa súhrnné vzorky v počte podľa bodu 5.B.3, pričom sa starostlivo zaznamená pôvod každej súhrnnej vzorky.

**6.4. Príprava konečných vzoriek**

Materiál v každej súhrnnej vzorke sa starostlivo premieša, čím sa získa homogenizovaná vzorka <sup>(1)</sup>. V prípade potreby sa súhrnná vzorka vopred zredukuje na vzorku s hmotnosťou najmenej 2 kg alebo objemom najmenej 2 l pomocou mechanického alebo automatického deliča alebo metódou štvrtienia.

Takto sa pripravujú aspoň tri konečné vzorky v približne rovnakom množstve, ktoré budú spĺňať kvantitatívne požiadavky bodu 5.A.4 alebo 5.B.4. Každá vzorka sa vloží do vhodnej nádoby. Urobia sa všetky potrebné opatrenia, aby sa zabránilo zmene zloženia vzorky, jej kontaminácii alebo znehodnoteniu, ktoré by mohlo vzniknúť počas prepravy alebo skladovania.

**6.5. Balenie konečných vzoriek**

Nádoby alebo obaly sa pečatia a označujú (celé označenie musí byť neoddeliteľnou súčasťou pečatenia) tak, aby sa nedali otvoriť bez porušenia pečate.

**7. ZÁZNAM O ODBERE VZORKY**

O každom odbere vzorky je potrebné viesť záznam, ktorý umožní jednoznačne rozoznať každú vzorkovanú partiu.

**8. MIESTO URČENIA VZORIEK**

Za každú súhrnnú vzorku sa v najrýchlejšom možnom čase zašle oprávnenému laboratóriu na analýzu aspoň jedna konečná vzorka spolu s informáciami potrebnými pre analytika.

---

<sup>(1)</sup> Hrudky sa pri každej súhrnnej vzorke rozbijú (v prípade potreby sa najskôr oddelia a neskôr vrátia k vzorke).

## 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 konečných vzoriek zasielaných kontrolným laboratóriám po odobratí vzoriek v súlade s ustanoveniami stanovenými v prílohe I.

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

## 2. Predbežné opatrenia

Postup prípravy vzorky, ktorý je potrebné dodržať, závisí od použitých analytických metód. Preto je mimoriadne dôležité zabezpečiť, aby bol tento postup prípravy vzorky primeraný použitej analytickej metóde.

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 mali vykonať čo možno najrýchlejšie 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 mikroprvkami.

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

Rozdeľte vzorku na niekoľko čiastkových vzoriek vhodných na analýzu a referenčné účely použitím vhodných techník delenia ako napr. striedavý odber lopatkou, stacionárne alebo krúživé deliace zariadenie. Delenia metódou kužeľov a štvrtienia sa neodporúčajú, keďže v ich dôsledku môžu vzniknúť dielčie vzorky s vysokou pravdepodobnosťou chyby z delenia. Vzorka sa uchová na referenčné účely vo vhodnej čistej a suchej nádobe so vzduchotesným uzáverom a pripraví sa z nej dielčie vzorky na analýzu s hmotnosťou najmenej 100 g spôsobom uvedeným nižšie.

3.1. *Krmivá, ktoré sa môžu priamo drviť*

Pokiaľ nie je v analytických metódach ustanovené inak, po pomletí sa celá vzorka podľa potreby preoseje cez sito so štvorcovými okami so stranami 1 mm (v súlade s odporúčaním ISO R565). Vyhnite sa nadmerne jemnému pomletiu.

Preosiata vzorka sa premieša a vloží do vhodnej čistej, suchej nádoby so vzduchotesným uzáverom. Bezprostredne pred navažovaním množstva určeného na analýzu sa znovu premieša.

3.2. *Krmivá, ktoré sa môžu drviť po vysušení*

Pokiaľ nie je v analytických metódach ustanovené inak, vzorka sa vysuší tak, aby sa jej vlhkosť znížila na 8 až 12 %, v súlade s postupom na preosušenie opísaným v bode 4.3 metódy na stanovenie vlhkosti uvedenej v časti A prílohy III. Ďalej sa postupuje podľa oddielu 3.1.

3.3. *Tekuté alebo polotekuté krmivá*

Vzorka sa vloží do vhodnej čistej, suchej nádoby so vzduchotesným uzáverom. Bezprostredne pred navažovaním množstva určeného na analýzu sa dôkladne premieša.

3.4. *Iné krmivá*

Vzorky, ktoré sa nedajú pripraviť v súlade s jedným z vyššie uvedených postupov, by sa mali upraviť akýmkoľvek iným postupom, ktorým sa zabezpečí, že množstvá navážené na analýzu budú homogénne a reprezentatívne konečné vzorky.

#### 4. Uskladnenie vzoriek

Vzorky sa musia skladovať pri teplote, ktorá nespôsobí zmeny v ich zložení. Vzorky určené na analýzu vitamínov alebo látok obzvlášť citlivých na svetlo by sa mali skladovať v nádobách z hnedého skla.

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

1. Pokiaľ nie je v analytických metódach ustanovené inak, tak všetky chemikálie musia byť analyticky čisté (a.p.). 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.

#### C. POUŽITIE ANALYTICKÝCH METÓD A VYJADRENIE VÝSLEDKOV

##### 1. Postup pri extrakcii

Niektoré metódy si vyžadujú špecifické extrakčné postupy. Vo všeobecnosti platí, že iné postupy pri extrakcii 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 maticu ako postup uvedený v metóde.

##### 2. Postup pri čistení

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

##### 3. Správa o použitej metóde analýzy

Vo všeobecnosti je ustanovená jedna analytická metóda na stanovenie každej látky v krmive. Pokiaľ sa uvádza niekoľko metód, v správe o analýze musí byť uvedená metóda použitá v kontrolnom laboratóriu.

##### 4. Počet stanovení

Výsledky uvádzané v správe o analýze predstavujú priemernú hodnotu získanú najmenej z dvoch paralelných stanovení vykonaných z dvoch samostatných navážiek vzorky a musia sa vyznačovať uspokojivou opakovateľnosťou.

Avšak v prípade analýzy nežiaducich látok, ak je 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 prípade kontroly deklarovaného obsahu látky alebo zložky, ak 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 určenie kvality.

V niektorých prípadoch sa tento prijateľný rozsah odchýlky definuje v právnych predpisoch, ako napr. v smernici Rady 79/373/EHS<sup>(1)</sup>.

##### 5. Správa o analytickom výsledku

Analytický výsledok sa vyjadruje spôsobom uvedeným v analytickej metóde na vhodný počet platných číslíc a podľa potreby sa koriguje na obsah vlhkosti v konečnej vzorke pred prípravou.

(<sup>1</sup>) Ú. v. ES L 86, 6.4.1979, s. 30.

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

Čo sa týka nežiaducich látok v zmysle smernice 2002/32/ES vrátane dioxínov a dioxínom podobných PCB, produkt určený ako krmivo pre zvieratá sa považuje za nevyhovujúci z hľadiska najvyššieho prípustného obsahu, ak sa na základe analytického výsledku najvyšší prípustný obsah pokladá za prekročený, pričom sa zohľadňuje rozšírená neistota merania a korekcia vzhľadom na návratnosť. Na posúdenie zhody sa používa analyzovaná koncentrácia upravená 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) upravený vzhľadom na návratnosť s uvedením miery návratnosti. Úprava 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, pomocou koeficientu 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 určenie kvality, a ak analýzy slúžia len na účely kontroly dodržania právnych ustanovení, môže sa podať správa o analytickom výsledku bez úpravy 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 kuželové 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/m<sup>2</sup>.
- 3.4. Elektricky vyhrievaná izotermická sušiareň ( $\pm 2$  °C), primerane vetraná, s možnosťou rýchlej regulácie teploty <sup>(1)</sup>.
- 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.

## 4.1. 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. Pomeľte 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 %.

<sup>(1)</sup> 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 %.

- 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 sušiarne 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 sušiarne 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 sušiarne 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. svätováňsky chlieb, hydrolyzované obilninové produkty, slad, sušené repné rezky, šfavy 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 sušiarne vráti na hodnotu od 80 °C do 85 °C. Opatrne upravte atmosférický tlak v sušiarne na pôvodnú hodnotu. Potom ju otvorte, ihneď na vysúšačku položte vrchnák, vyberte ju zo sušiarne, nechajte v exsikátore (3.6) za 30 až 45 minút vychladnúť a odvážte s presnosťou na 1 mg. Sušte ďalších 30 minút vo vákuovej sušiarne pri teplote od 80 °C to 85 °C a opäť odvážte. Rozdiel medzi dvomi váženiami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

- 4.3. Predsušenie

- 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 predsušiť 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 sušiarne 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 predsušiť, 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 odvážite 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 predsušenia

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

kde:

m = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,

m<sub>0</sub> = hmotnosť vysušenej skúšobnej vzorky v gramoch.

### 5.2. Sušenie s predsušením

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

kde:

m = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,

m<sub>1</sub> = hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch po predsušení,

m<sub>2</sub> = hmotnosť skúšobnej vzorky po rozdrvení alebo pomletí v gramoch,

m<sub>0</sub> = hmotnosť vysušenej skúšobnej vzorky v gramoch.

### 5.3. 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 spevnou 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 ± 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 dvomi 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:

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

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. =  $114 \text{ }^\circ\text{C}$ , N-obsah = 10,36 %).
- 3.14. Sacharóza (bez dusíka).
- 3.15. Kyselina boritá ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).
- 3.16. Indikátorový roztok metylčervene: rozpustíte 100 mg metylčervene v 100 ml etanolu alebo metanolu.
- 3.17. Roztok bromkrezolovej zelene: rozpustíte 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 metylčerven 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  $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$ .

*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).

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 predestilovania 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).

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:

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

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 zachytávací banka destilačného prístroja nie je vybavená prikvpávacím 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 rutinnej 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.

**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 ( $\rho_{20}$  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 feroxyanidu 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, potrepte 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 absorbanciu roztoku vzorky pomocou spektrofotometra pri 420 nm. Porovnajete 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 absorbanciu 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.

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, absorbanciu 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 NH<sub>3</sub>.
- 3.4. Nasýtený roztok uhličitanu draselného: Rozpustíte 100 g uhličitanu draselného v 100 ml vriacej vody. Nechajte vychladnúť a prefiltrujte.
- 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 potrepote 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. Čiastočne prikryte vazelínou 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.

**6. Výpočet výsledkov**

1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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:

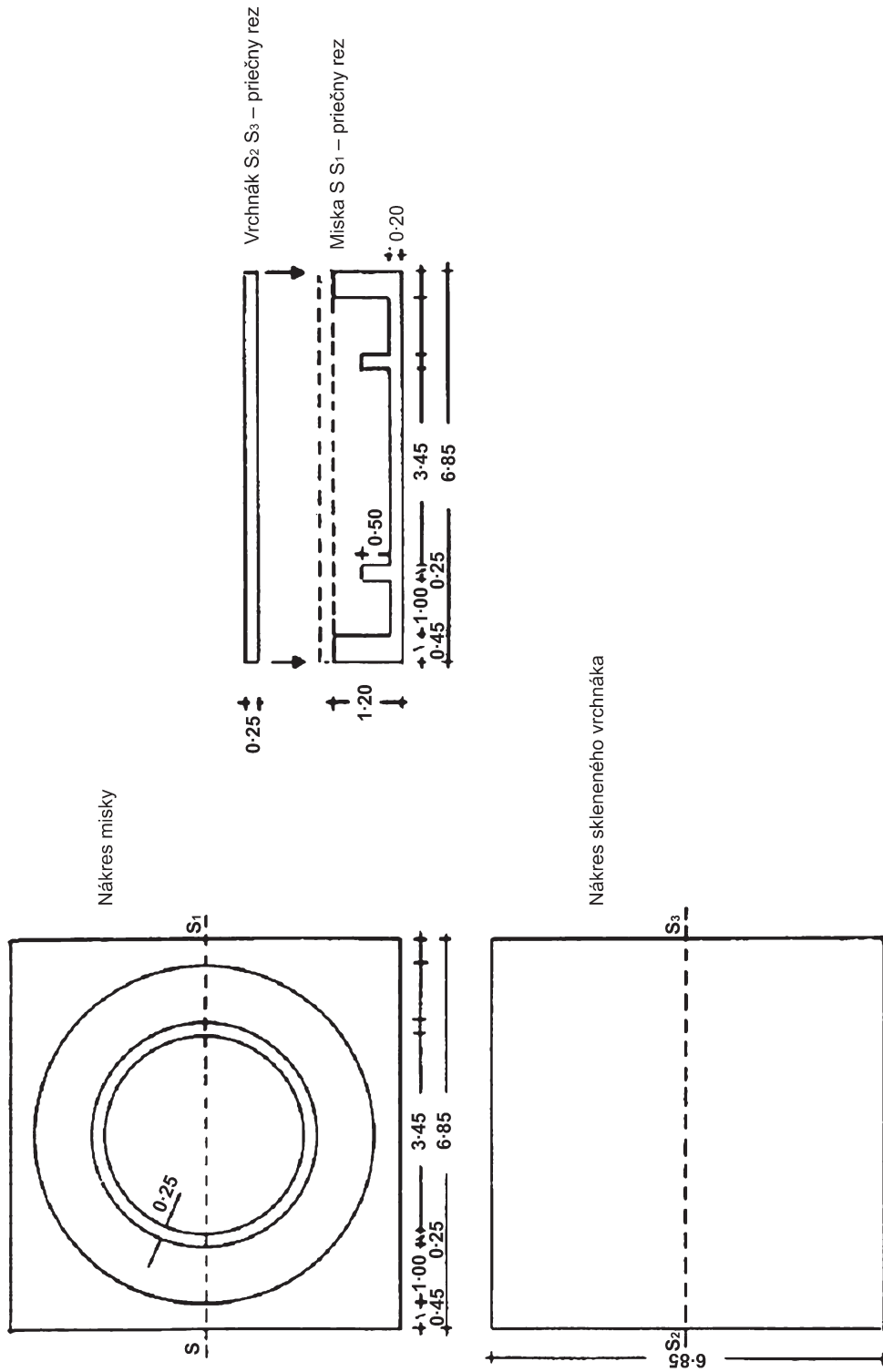
- 10 % v relatívnej hodnote pre obsah amoniaku nižší ako 1,0 %,
- 0,1 % v absolútnej hodnote pre obsah amoniaku 1,0 % alebo viac.

**7. Poznámky**

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

CONWAYOVE MISKY

Mierka 1/1



## II. DESTILÁCIU

## 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 potrepote 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 *slепý pokus* podľa toho istého postupu, no bez vzorky, ktorá sa má analyzovať.

## 6. Výpočet výsledkov

1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 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 hydroxyanalogov 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 hydrolyzou zoxidať 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 permravčej a fenolu. Prebytočné oxidačné činidlo sa rozloží pomocou disiričitanu disodného. Oxidovaná alebo neoxidovaná vzorka sa hydrolyzuje 23 hodín kyselinou chlorovodíkovou (3.20). Hodnota pH hydrolyzátu 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.

3.14. Plyný 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  $c = 7,5 \text{ mol/l}$ :  
Rozpusťte 300 g NaOH (3.5) vo vode a objem doplňte na 1 liter.
- 3.18. Roztok hydroxidu sodného  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
Rozpusťte 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,  $c = 6 \text{ mol HCl/l}$  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,  $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$  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,  $\beta = 6 \%$ :  
Rozpusťte 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,  $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$ , pH 2,20:  
Rozpusťte 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.
- 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,  $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ .  
Rozpusťte 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 °C najviac podoba 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,  $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ .

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

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

Składujte pri teplote pod  $5^\circ\text{C}$  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.

Składujte pri teplote pod  $5^\circ\text{C}$  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  $\pm 2^\circ\text{C}$ .
- 4.4. pH meter (s presnosťou na tri desatinné miesta).
- 4.5. Membránový filter ( $0,22 \mu\text{m}$ ).
- 4.6. Odstredivka.
- 4.7. Rotačná vákuová odparka.
- 4.8. Mechanická trepačka alebo magnetické miešadlo.
- 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 živícami, 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 mravčej 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  $40^\circ\text{C}$ .

#### 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  $50^\circ\text{C}$ , alebo lyofilizáciou. Vzorky s vysokým obsahom tuku treba pred mletím extrahovať s petroléterom (3.12).

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

Navážte s presnosťou na 0,2 mg primerané množstvo (1 – 5 g) pripravenej vzorky (5.1) do Erlenmeyerovej banky a pridajte 100,0 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 ml z roztoku nad sedimentom do kadičky s objemom 100 ml.

Primiešajte 5,0 ml roztoku kyseliny 5-sulfosalicylovej (3.22) a pokračujte v miešaní pomocou magnetického miešadla po dobu 5 minút. Roztok nad sedimentom odstredte alebo prefiltrujte, aby sa odstránili všetky zrazeniny. Preneste 10,0 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 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 mg 0,1 – 1 g pripravenej vzorky (5.1) do:

- 100 ml banky s guľatým dnom (4.1) na otvorenú hydrolyzu (5.3.2.3) alebo
- 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 hydrolyzu 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 ochlaďte 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 utesnenou 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. Hydrolyza

#### 5.3.2.1. Hydrolyza 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 hydrolyzy postupujte podľa 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

#### 5.3.2.2. Hydrolyza 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 hydrolyza

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

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.

#### 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)*

Veźmite 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 preneste 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 doplňte po značku tlmivým roztokom (3.24).

Ak ešte nebol použitý vnútorný štandard, pridajte 2,00 ml vnútorného štandardu (3.27.3) a doplňte 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 laboratórnú 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 ± 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.

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 píkov 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 píkov 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 odtučnená),

V = celkový hydrolyzát 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.

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 (krmna zmes pre ošípané, krmna 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
Krmna zmes pre ošípané	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Krmna 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
Krmna zmes pre ošípané	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Krmna 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

**Variačný koeficient (%) vnútrolaboratórnej smerodajnej odchýlky ( $S_r$ )**

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
Krmna zmes pre ošípané	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Krmna zmes pre brojlerov	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

Referenčný materiál	Aminokyselina			
	Treonín	Cyst(e)ín	Metionín	Lysín
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
Kýmna zmes pre ošípané	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Kýmna 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
Kýmna zmes pre ošípané	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Kýmna 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

## 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 pík boli v strede rozsahu.

- 9.2. V prípade použitia zariadenia na vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu na analýzu hydrolyzátov 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)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O (ktorý sa nesmie nechať dlho na vzduchu, aby sa nevytváral BaCO<sub>3</sub>, 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, ρ<sub>20</sub> 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanol, čistoty HPLC.
- 3.9. Petroléter, rozpätie bodu varu 40 – 60 °C.
- 3.10. Roztok hydroxidu sodného c = 1 mol/l:  
  
Rozpustite 40,0 g NaOH (3.5) vo vode a objem doplňte vodou na 1 liter (3.1).
- 3.11. Kyselina chlorovodíková, c = 6 mol/l:

Veźmite 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  $\alpha$ -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 ( $\alpha$ -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  $\times$  4 mm, s náplňou  $\text{C}_{18}$ , 3  $\mu\text{m}$  alebo ekvivalentná
- 4.3. pH meter.
- 4.4. Polypropylénová banka, objem 125 ml so širokým hrdlom a závitovým uzáverom.
- 4.5. Membránový filter, 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.6. Autokláv, 110 ( $\pm$  2)  $^\circ\text{C}$ , 1,4 ( $\pm$  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)<sub>2</sub>.8 H<sub>2</sub>O. Jemne potrepte alebo premiešajte. Pridajte 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnútorného štandardu (α-metyl-tryptofán) (3.16). Nechajte nádobu 15 minút ochladzovať vo vodnom/ladovom 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 vyžrážanie.

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 (4.2):	125 mm × 4 mm, s náplňou C <sub>18</sub> , 3 µm alebo ekvivalentná
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, emisía: 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),

V<sub>1</sub> = 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),

V<sub>2</sub> = 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),

V<sub>3</sub> = 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.

## 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 hydrolyzu. 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 <sub>r</sub> [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV <sub>r</sub> [%]	1,9	1,6	1,9
S <sub>R</sub> [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV <sub>R</sub> [%]	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<sub>r</sub> = smerodajná odchýlka opakovateľnosti,

S<sub>R</sub> = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti,

r = opakovateľnosť,

R = reprodukovateľnosť,

CV<sub>r</sub> = variačný koeficient opakovateľnosti, %,

CV<sub>R</sub> = 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 Zmes pšenice a sóje	Vzorka 5 Zmes pšenice a sóje (= vzorka 4) s pridaným tryptofanom (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, %

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  $\alpha$ -metyl-tryptofánu.

Izokratické eluovanie, po ktorom nasleduje gradientové čistenie kolóny:

Kolóna na kvapalinovú hromatografiu:	125 mm × 4 mm, s náplňou C <sub>18</sub> , 5 µm alebo ekvivalentná		
Teplota kolóny:	32 °C		
Mobilná fáza:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /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 tryptofánom a vnútorným štandardom. Okrem toho je dôležité, aby sa produkty degradácie dobre oddelili od tryptofánu a vnútorného 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 píkov – 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 bárnatej*

Čím je hydroxid bárnatej starší, tým sa ťažšie rozpúšťa. Výsledkom je nečírý 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.

## 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 sífonom (Soxhletov prístroj), prietoková rýchlosť musí byť taká, aby vykazovala 10 cyklov za hodinu; ak ide o zariadenie bez sífónu, 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<sup>(1)</sup>.

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.

Ochlaďte 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 hydrolyzou musí extrahovať petroléterom podľa postupu A.

<sup>(1)</sup> V prípade, že olej musí byť následne podrobený testovaniu, nahraďte fragmenty pemzového kameňa sklenenými guľôčkami.

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

Vložte dvojitý 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 (neprikladajte 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 hydrolyzou 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.
- 8.6. Ak je obsah oleja/tuku vyšší ako 15 %, tak sa odporúča predbežná extrakcia podľa postupu A pred hydrolyzou 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 frite, 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 (Celite 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  $\mu\text{m}$ . 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).

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

Uvedte tekutinu do varu v priebehu  $5 \pm 2$  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). Uveďte tekutinu do varu v priebehu  $5 \pm 2$  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 exsikátore a rýchlo odvážite. 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 exsikátore pred vážením.

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

## 6. Výpočet výsledkov

Obsah vlákniny 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 vlákniny nižší ako 10 %,

— 6 % relatívnych z hodnoty vyššieho výsledku pre obsah vlákniny 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 po sebe nasledujúcimi 30 ml dávkami petroléteri, 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 petroléteri. 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  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feročyanidu draselného,  $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$ . 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.
- 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;  $Na_2 CO_3$  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  $Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ , bez obsahu železa v 100 ml vody.

- 3.8.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustite 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  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. Doplňte 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 cibuľového zafarbenia. Pridajte 15 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.6), banku ponorte do kúpeľa s vriacou vodou a nechajte v ňom tridsať minút. Rýchlo ochlaďte 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 vyčisteného 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 zohrieval len dno Erlenmeyerovej banky. K Erlenmeyerovej banke pripevnite spätný chladič. Varte presne desať minút. Okamžite ochlaďte 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. Vyčírte 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 dextringovaný škrob, doplňte objem destilovanou vodou.

- 7.2. Ak ide o melasu a kŕmne suroviny bohaté na cukry a neobsahujúce takmer žiadny škrob (svätójánsky 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. Vyčírte 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).
- 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 vyčírení).

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 vyjadří ako percento vzorky.

### Príklad

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 Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 mol/liter, pri dvojminútovom zahrievaní a 10 min. varu

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/liter	Glukóza, fruktóza, invertné cukry C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Laktóza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltóza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/liter
	ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	mg	
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

#### 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 vycírení a prefiltrovaní sa obsah laktózy vo filtráte stanoví Luff-Schoorlovou 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 Zn(CH<sub>3</sub> COO)<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feroxyanidu draselného K<sub>4</sub> Fe (CN)<sub>6</sub> 3H<sub>2</sub>O. Doplňte 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 doplňte vodou na objem 1 liter. Nechajte cez noc odstáť a prefiltrujte. Skontrolujte koncentráciu takto získaného činidla (Cu 0,05 mol/liter; Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 1 mol/liter). Hodnota pH roztoku má byť približne 9,4.

- 3.4.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustíte 25 g pentahydrátu síranu meďnatého  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  neobsahujúceho železo v 100 ml vody.
- 3.4.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustíte 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: rozpustíte 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. Doplňte objem vodou na 100 ml, potrepte a prefiltrujte. 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 privedte 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 zohrieval len dno Erlenmeyerovej banky. Na Erlenmeyerovú banku nasadte spätný chladič. Varte presne desať minút. Okamžite ochlaďte 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 bezvodnej 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 Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 mol/liter, pri dvojminútovom zahrievaní a 10 min. varu

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/liter	Glukóza, fruktóza, invertné cukry C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Laktóza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltóza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/liter
	ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	mg	
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

#### 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<sup>(1)</sup>.

#### 2. Podstata metódy

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

Pri druhom stanovení sa vzorka extrahuje 40 % etanolom. Po okyslení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčírení 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.

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES L 125, 23.5.1996, s. 35.



- 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: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte objem vodou na 100 ml.
- 3.4. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feročyanidu draselného,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . 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. *Príprava vzorky*

Vzorku meľte dovtedy, 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 a sústavne pretrepávajte, 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 pretrepávajte približne 30 sekúnd. Potom pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.4) a znovu pretrepávajte 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 nasadte 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.

Vyčírte 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*

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

P = celková optická otáčavosť v uhlových stupňoch,

- $P'$  = optická otáčavosť v uhlových stupňoch látok rozpustných v 40 % (V/V) etanole,  
 $[\alpha]_D^{20}$  = 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

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

- $S$  = celková optická otáčavosť v sacharimetrových stupňoch,  
 $S'$  = optická otáčavosť v sacharimetrových stupňoch látok rozpustných v 40 % (v/v) etanole,  
 $N$  = hmotnosť (g) sacharózy v 100 ml vody poskytujúca optickú otáčavosť 100 sacharimetrových 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 stanovaní obsahu škrobu polarimetrovou 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 kopyry; extrahovaný šrot z kopyry,
  - 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.

##### 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 napučať) a vložte do spaľovacieho téglíka, ktorý ste vopred vyžíhali 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 kalibrovanj muflovej pece nastavenej na teplotu 550 °C. Túto teplotu udržiavajte až do získania bieleného, bledosivého alebo červenkastého popola, bez obsahu uhlíkatých častíc. Vložte téglík do exsíkátora, nechajte vychladnúť a okamžite odvážte.

5.2. Téglík vložte do kalibrovanj muflovej pece vyhriatej na 550 °C. Spopolňujte 3 hodiny. Vložte téglík do exsíkátora, 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. Zuholňujte 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.

#### 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 krmné suroviny organického pôvodu a na väčšinu krmných zmesí.
- 1.2. *Metóda B*: uplatniteľná na minerálne zlúčeniny a zmesi a na krmné 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 privedte do varu a nechajte mierne vriieť 15 minút. Teplý roztok prefiltrujte cez bezpopulový 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 exsikátore 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 šumiť. Pridajte ďalších 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Počkajte, kým sa prestane uvoľňovať akýkoľvek plyn, potom kadičku vložte do vriaceho vodného kúpeľa na 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) nahraďte 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 naváženú 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 vyteciť 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).

#### 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,

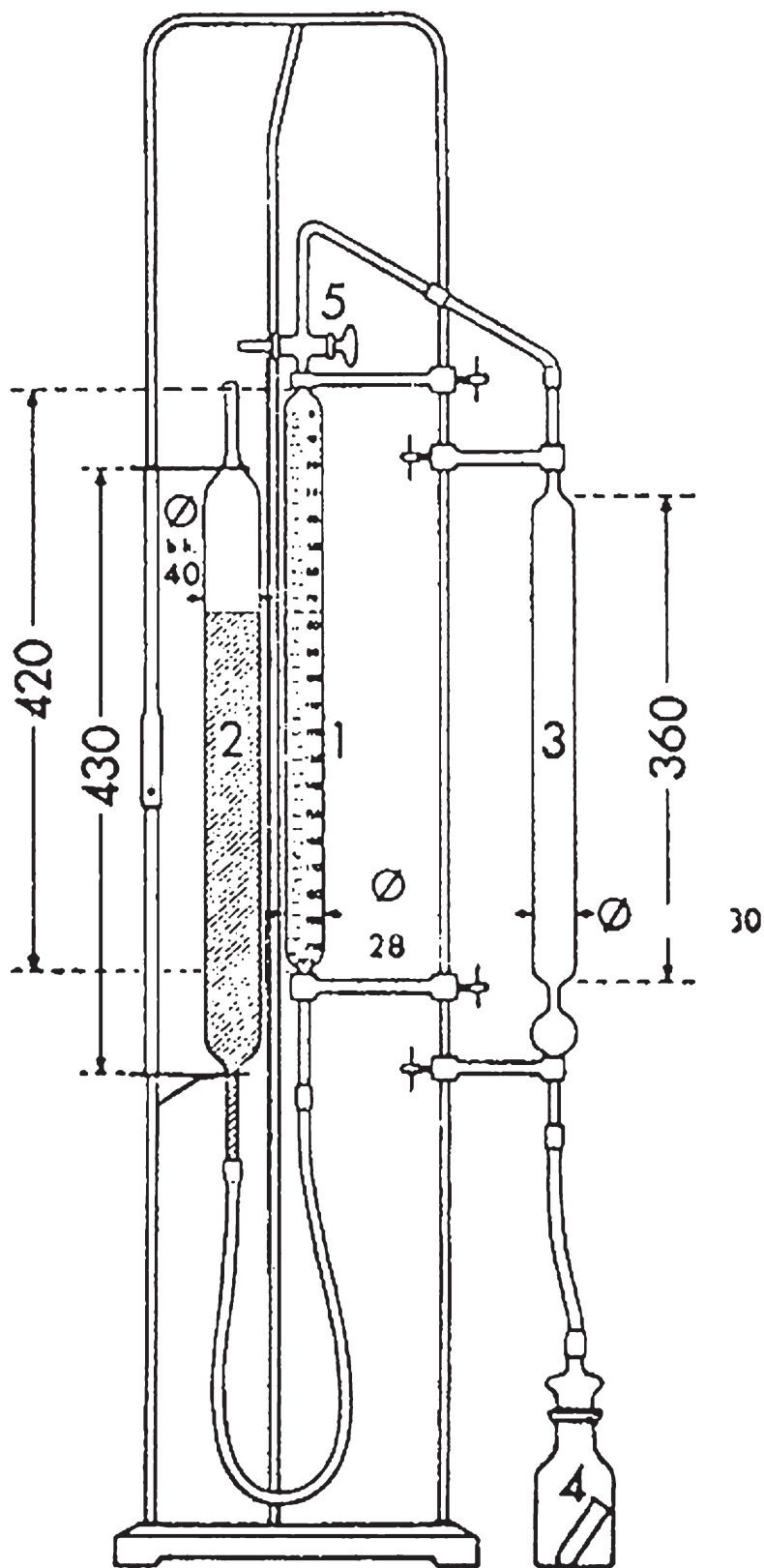
V = ml CO<sub>2</sub> uvoľneného z navážky vzorky,

V<sub>1</sub> = ml CO<sub>2</sub> uvoľneného z 0,5 g CaCO<sub>3</sub>,

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<sub>2</sub>

(v mm)

## 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 molybdátovanádovým činidlom. Optická hustota takto vzniknutého žltého roztoku sa meria spektrofotometrom pri 430 nm.

**3. Chemikálie**

3.1. Uhličitan vápenatý.

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

3.3. Kyselina dusičná,  $\rho_{20}$  1,045 g/ml.

3.4. Kyselina dusičná,  $\rho_{20}$  1,38 až 1,42 g/ml.

3.5. Kyselina sírová,  $\rho_{20}$  1,84 g/ml.

3.6. Molybdátovanádové 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  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  v 400 ml horúcej vody. Za stáleho miešania pomaly pridajte 20 ml zriedenej kyseliny dusičnej (7 ml  $\text{HNO}_3$  (3.4) + 13 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Doplňte vodou na objem 1 liter.

**4. Prístrojové vybavenie**

4.1. Kremenné, porcelánové alebo platinové spaľovacie tégliky.

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. *Príprava 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 prilepeniu na steny banky, zahrejte a 10 minút udržiajte na bode varu. Nechajte pomaly vychladnúť, pridajte 2 ml kyseliny dusičnej (3.4), jemne zahrejte, nechajte pomaly vychladnúť, pridajte trochu viac kyseliny dusičnej (3.4) a priveďte znovu do bodu varu. Tento postup opakujte, až kým nezískate bezfarebný roztok. Ochladte, 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 téglíka. Miešajte skúšobnú vzorku, až kým sa úplne nespojí s 1 g uhlíčitanu 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 šumiť. 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 kúpeľi 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. Vyfarbenie a meranie optickej hustoty

Zriedte 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 vnesením 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.

## 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, vyčirí 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: 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.
- 3.8. 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.
- 3.9. 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**

Pripravte 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.

**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 odstredte), 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 železito-amónneho (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 červenasto-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 LÁTOK 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 aktivite 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 petroléteru. 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 °C – 60 °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,  $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$  v glycerole,  $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$  (pre  $x = 9$ ) (pozri poznámku 7.8)
- 3.7. Roztok fenolftaleínu,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  v etanole (3.1)
- 3.8. 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.  $2,80 \times 10^6 \text{ m.j.}/\text{g}$ 
  - 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.  $1,80 \times 10^6 \text{ m.j.}/\text{g}$ 
  - 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.

3.1.3. 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 spojkom, s prípojkou na privod 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 C<sub>18</sub>, 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 kvetami

4.7. Vodný kúpeľ s magnetickým miešaním

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

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

4.8.2. sklenej 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 (vytlačí sa dusíkom). Počas extrakcie sa vzduch nad kvapalinou nahradí dusíkom (zabráňte nadbytočnému tlaku občasným uvoľnením zátky).

5.1. *Príprava vzorky*

Zomelte 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.

5.2. *Zmydlenie*

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 ochlaďte 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 petroléтеру (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 petroléтеру do ďalšieho oddeľovacieho lievika (4.2.3). Zopakujte túto extrakciu dvakrát so 100 ml petroléтеру (3.2) a dvakrát s 50 ml petroléтеру (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 fenoltaleínu (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 petroléтеру (3.2), banku doplňte po značku petroléтером (3.2) a dobre zamiešajte.

5.3.2. *Extrakcia v extrakčnej aparatúre (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 petroléтеру do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3). Do skleneného valca pridajte 100 ml petroléтеру (3.2), zazátkujte a dobre premiešajte. Nechajte oddeliť vrstvy a hornú vrstvu preneste opäť do oddeľovacieho lievika. Opakujte extrakciu ďalšími 100 ml petroléтеру (3.2), potom dvakrát po 50 ml petroléтеру (3.2) a vrstvy petroléтеру pridajte do oddeľovacieho lievika.

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

5.4. *Príprava roztoku vzorky pre HPLC*

Alikvotnú časť roztoku petroléтеру (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 (3.10) a vyberte banku z rotačnej odparky. Odstráňte zvyšné rozpúšťadlo prúdom dusíka (3.10) a zvyšok ihneď rozpustite 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 C<sub>18</sub> (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<sub>18</sub>, 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 vitamín A acetátu (3.11.1) alebo 20 ml zásobného roztoku vitamín 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 rozpustite 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  $\mu$ l 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).

## 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:

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

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

## 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:

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

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

## 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:

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

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

## 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).

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<sub>1</sub> = objem roztoku vzorky (5.4) v ml,

V<sub>2</sub> = 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 trešče 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 spočítať.
- 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



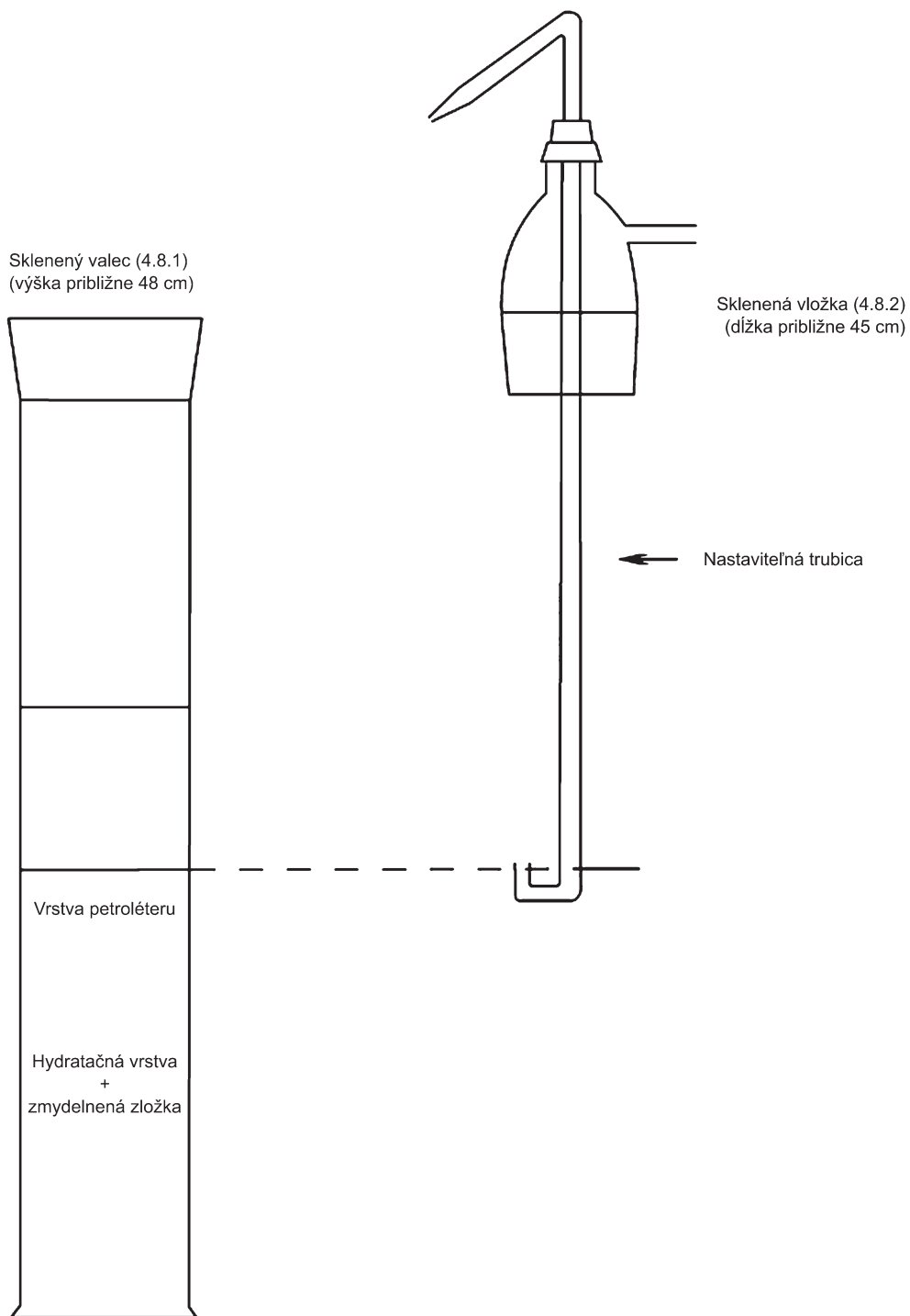
9. Výsledky medzilaboratórneho štúdia <sup>(1)</sup>

	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 <sub>r</sub> [%]	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 <sub>R</sub> [%]	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<sub>r</sub> = variačný koeficient opakovateľnosti  
 CV<sub>R</sub> = variačný koeficient reprodukovateľnosti

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

Obrázok 1: Extrakčná aparatúra (4.8)



**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- $\alpha$ -tokoferol acetátu na kg. 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu zodpovedá 0,91 mg DL- $\alpha$ -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,  $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$  v glycerole,  $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$  (pre  $x = 9$ ) (pozri poznámku 7.8)
- 3.7. Roztok fenoltaleínu,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  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- $\alpha$ -tokoferol acetát, extra čistý, so zaručenou aktivitou
  - 3.10.1. Zásobný roztok DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu: do 100 ml odmernej banky navážte 100 mg DL- $\alpha$ -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- $\alpha$ -tokoferol acetátu (pozri UV kontrolu v bode 5.6.1.3 a stabilizáciu v poznámke 7.4).
- 3.11. DL- $\alpha$ -tokoferol, extra čistý, so zaručenou aktivitou
  - 3.11.1. Zásobný roztok DL- $\alpha$ -tokoferolu: do 100 ml odmernej banky navážte 100 mg DL- $\alpha$ -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- $\alpha$ -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
- 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 spojkom, 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 C<sub>18</sub>, 5 alebo 10 µm alebo ekvivalentná
- 4.5.2. Fluorescenčný alebo UV detektor s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou
- 4.6. Spektrofotometer s 10 mm kremennými kvetami
- 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 (vytlačiť 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 ochlaďte obsah banky na laboratórnu teplotu.

### 5.3. Extrakcia

Po dekantácii a po premytí celkovým objemom 250 ml vody zmydlený roztok kvantitatívne preneste do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3) alebo do extrakčnej aparátúry (4.8). Vymyte zmydľovacia banku postupne 25 ml etanolu (3.1) a 100 ml petroléru (3.2) a preneste tieto kvapaliny do oddeľovacieho lievika alebo do extrakčnej aparátúry. 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 fenolfaleínu (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 petroléteri (3.2), banku doplňte po značku petroléterom (3.2) a dobre zamiešajte.

#### 5.3.2. Extrakcia v extrakčnej aparatúre (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 petroléteri do 1 000 ml oddeľovacieho lievika (4.2.3). Do skleneného valca pridajte 100 ml petroléteri (3.2), zazátkujte a dobre premiešajte. Nechajte oddeliť vrstvy a hornú vrstvu preneste opäť do oddeľovacieho lievika. Opakujte extrakciu ďalšími 100 ml petroléteri (3.2), potom dvakrát po 50 ml petroléteri (3.2) a vrstvy petroléteri pridajte do oddeľovacieho lievika.

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

#### 5.4. Príprava roztoku vzorky pre HPLC

Alikvotnú časť roztoku petroléteri (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 atmosferický 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 C<sub>18</sub> (4.5.1) a koncentrácia sa zmeria fluorescenčným detektorom (excitácia: 295 nm, emisia: 330 nm) alebo UV detektorom (292 nm) (4.5.2).

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<sub>18</sub> 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- $\alpha$ -tokoferol acetát alebo DL- $\alpha$ -tokoferol)

##### 5.6.1. Štandard DL- $\alpha$ -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- $\alpha$ -tokoferol acetátu (3.10.1) a hydrolyzujte podľa bodu 5.2. Následne extrahujte petroléterom (3.2) podľa bodu 5.3 a doplňte petroléterom 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 rozpustite v 25,0 ml metanolu (3.3). Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 45,5 µg DL- $\alpha$ -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- $\alpha$ -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- $\alpha$ -tokoferol acetátu (3.10.1).*

Zriedte 5,0 ml zásobného roztoku DL- $\alpha$ -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 zriadení sa musí dosiahnuť extinkčná hodnota 0,84 až 0,88.

#### 5.6.2. *Štandard DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu*

##### 5.6.2.1. *Príprava pracovného štandardného roztoku*

Do 50 ml odmernej banky napipetujte 2 ml zásobného roztoku DL- $\alpha$ -tokoferolu (3.11.1), rozpustite v metanole (3.3) a doplňte objem metanolom po značku. Nominálna koncentrácia tohto roztoku je 40 µg DL- $\alpha$ -tokoferolu na ml, čo zodpovedá 44,0 µg DL- $\alpha$ -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 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferolu, t. j. 2,20, 4,40, 8,79 a 22,0 µg/ml DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu.

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

##### 5.6.2.3. *UV štandardizácia zásobného roztoku DL- $\alpha$ -tokoferolu (3.11.1).*

Zriedte 2,0 ml zásobného roztoku DL- $\alpha$ -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. Absorbčné maximum má byť pri 292 nm:

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

Pri tomto zriadení 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 µg/ml (vypočítanú ako  $\alpha$ -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  $\alpha$ -tokoferol acetát) roztoku vzorky (5.4) v µg/ml,

V<sub>1</sub> = objem roztoku vzorky (5.4) v ml,

V<sub>2</sub> = objem odobranej 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.
- 7.4. Po spektrofotometrickom zmeraní roztoku DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu alebo DL- $\alpha$ -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 použiť hydrochinón
- 7.6. Použitím kolóny s normálnou fázou je možné oddeliť  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\chi$  a  $\delta$ -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 <sup>(1)</sup>**

	Premix	Premixové krmivo	Mínérálny 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

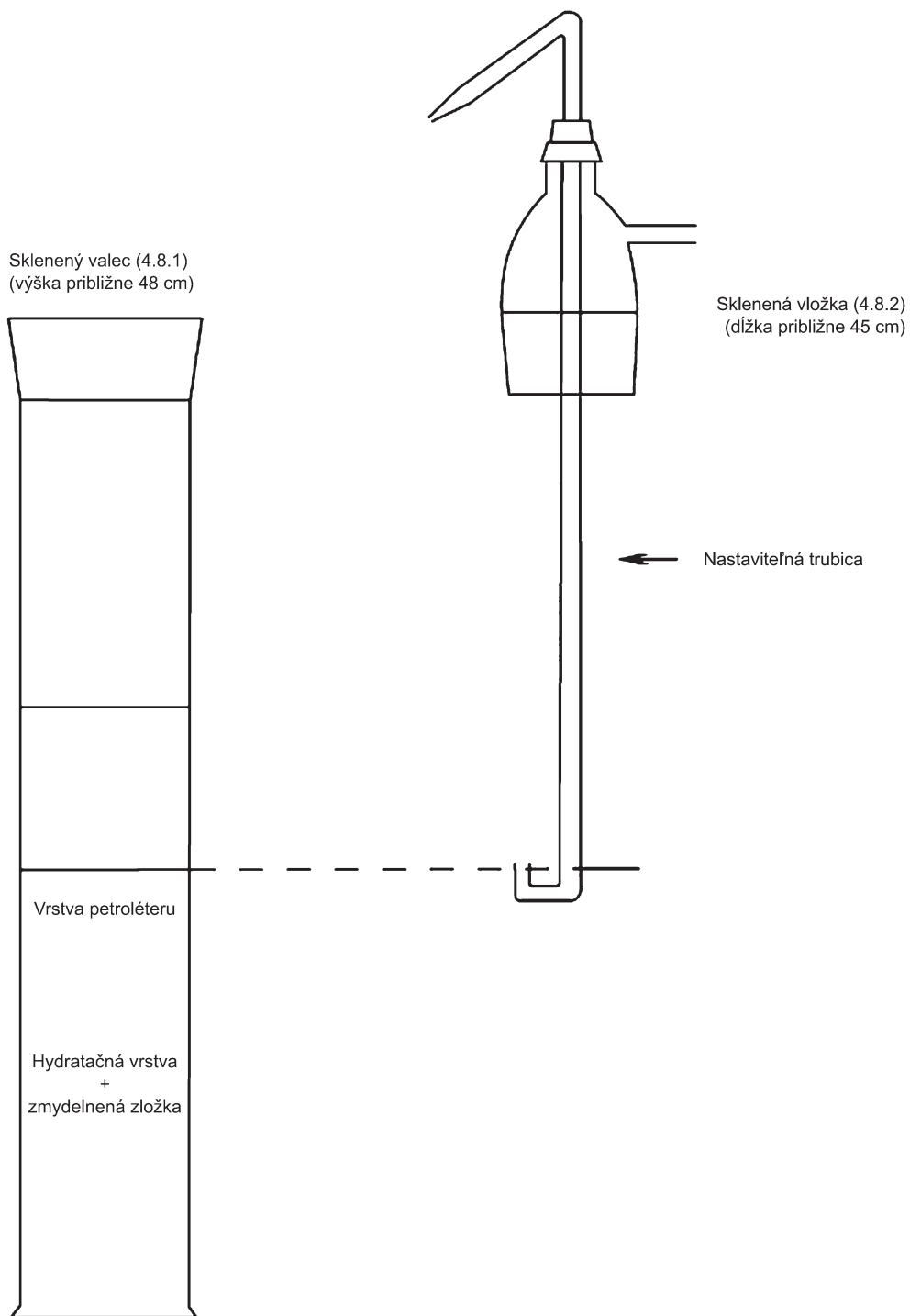
R = reprodukovateľnosť

$CV_r$  = variačný koeficient opakovateľnosti

$CV_R$  = variačný koeficient reprodukovateľnosti

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

Obrázok 1: Extrakčná aparatúra (4.8)





## 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 doplníte 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 doplníte 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.
- 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 <sup>(1)</sup>

- 5.1. Vzorky s obsahom organických látok
- 5.1.1. Spopolnenie a príprava roztoku na analýzu <sup>(2)</sup>
- 5.1.1.1. Vložte 5 až 10 g vzorky odváženej s presnosťou na 0,2 mg do kremenného alebo platinového téglíka (pozri poznámku b), vysušte v sušiarňi pri 105 °C a vložte téglík 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 udržiajte 4 až 16 hodín (napr. cez noc), aby sa odstránil uhlíkatý materiál, a potom pec otvorte a nechajte vychladnúť [pozri poznámku d)].

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<sub>2</sub> môže vzniknúť prudká reakcia). Pridávajte kyselinu chlorovodíkovú (3.1) po kvapkách za miešania, kým roztok celkom neprestane šumiť. Odparujte dosucha za občasného premiešania sklenenou tyčinkou.

<sup>(1)</sup> Môžu sa použiť iné metódy digestie za predpokladu, že sa dokázalo, že majú podobné výsledky (ako mikrovltná tlaková digestia).

<sup>(2)</sup> 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 filtráciu. Dvakrát premyte filtračný papier obsahujúci nerozpustné rezíduum vriacou vodou a vložte ho do kremenného alebo platinového téglíka. Spaľujte v muflovej peči (4.1) pri teplote pod 550 °C, kým sa všetok uhlíkatý 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 rozpustite 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.

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 nevidíte, 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 sklenenými 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.

**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							

**Meď**

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

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 pridaním 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
- 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, rozpustíte 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). Doplnite 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, ( $\rho_{20}$  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 nenasýti.
- 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  $\mu$ m 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.
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  $\times$  4 mm, s náplňou  $C_{18}$ , 10  $\mu$ m alebo ekvivalentná
- 4.5. Sklenená kolóna (300 mm  $\times$  10 mm) vybavená sklenenou filtračnou fritou a uzatváracím kohútom
- 4.6. Filtre so sklenenými 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. Vykonať 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. Odstreďujte 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.

Kvantitatívne preneste vodnú vrstvu do 250 ml banky s guľatým dnom a odstráňte organickú fázu. Odparte všetok zvyšný octan etylnatý z kyselinového 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), spustite 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. Rozpustite zvyšok v mobilnej fáze (3.21) a kvantitatívne preneste do 10 ml odmernej banky. Doplnite 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).

##### 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 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 spektra 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:

- 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  $\pm 2$  nm;
- 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 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;
- 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 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 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 <sup>(1)</sup>, 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.

<sup>(1)</sup> The Analyst 108, 1983, str. 1 252 až 1 256.

**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.

## 3.3. Acetonitril, čistoty HPLC

## 3.4. Molekulové sito

Typ 3A, guľôčky, 8 – 12 mešov (guľôčky o veľkosti 1,6 – 2,5 mm, kryštalický hlinitokremičitan, 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 rozpustite 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 rozpustite 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  $\mu$ m 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  $\mu$ g/ml

Navážte 30 mg štandardnej látky robenidínu (3.9) s presnosťou na 0,1 mg. Rozpustite 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). Doplňte 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

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 C<sub>18</sub>, 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.

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 rozpustite 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 píkovo a konštantné retenčné časy.

5.4.2. *Kalibračný graf*

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.9.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkovo 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 píkovo 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.

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:

- 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  $\pm 2$  nm;
- 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;
- spektrá zostupnej 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:

	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 C<sub>18</sub>. 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,  $\rho_{20} = 1,19$  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  $\leq 4$  °C je roztok stály 1 mesiac.

3.8.2. Štandardný roztok diklazurilu, 50 µg/ml.

Preňte 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  $\leq 4$  °C je roztok stály 1 mesiac.

3.9. Vnútorný štandard: 2,6 dichloro- $\alpha$ -(4-chlorofenyl)-4-(4,5 dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2 (3H) - yl)  $\alpha$ -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  $\leq 4$  °C je roztok stály 1 mesiac.

3.9.2. Roztok vnútorného štandardu, 50 µg/ml.

Preňte 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  $\leq 4$  °C je roztok stály 1 mesiac.

3.9.3. Roztok vnútorného štandardu na premixy, p/1 000 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  $\leq 4$  °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<sub>18</sub> s tuhou 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).

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 × 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, obohati 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. 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 rozpustite 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 tetrabutyl-amónium hydrogénsulfátu

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:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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 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  $\pm 2$  nm;
- 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 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) spektra 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 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 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

Vykonal 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  
 $S_R$  = 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

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

Rozpustíte 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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<sub>34</sub>H<sub>53</sub>O<sub>8</sub>Na (sodná soľ polyéru 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, rozpustíte v okyslenom metanole (3.8), doplňte po značku okysleným metanolom a premiešajte. Tento roztok sa musí pripravovať čerstvo pred použitím.

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 metalonom (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 C<sub>18</sub>, 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, obohati 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 približne 40 °C, potom ju vyberte a ochlaďte na laboratórnú 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 ochlaďte na laboratórnú teplotu. Doplňte 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). Rozriedte 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 <sub>18</sub> , 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) píkovo a konštantné retenčné časy.

## 5.3.2. Kalibračný graf

Nastrekajte každý kalibračný roztok (3.10.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračný graf, pričom použite priemerné výšky (plochy) píkovo ako ordináty (os y) a príslušné koncentrácie v µg/ml ako abscisy (os x).

## 5.3.3. Roztok vzorky

Nastrekajte 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) píkovo pre hodnoty píkovo 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.

## 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,  
V<sub>1</sub> = 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,  
V<sub>2</sub> = 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 spektrofluorometrii 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  $\pm 10\%$  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 %.

## 8. Výsledky medzilaboratórnej štúdie

Vykonal 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 stanovenie voľného gosypolu, alebo dimetylformamidom, ak ide o stanovenie 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.

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 lievnik 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 vodným kúpeľom. Ochlaďte 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. Ochlaďte 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:

Prípravte 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).

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. Ochladte 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:

Prípravte 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. Ochladte 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. Ochladte 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.

## B. STANOVENIE OBSAHU DIOXÍNOV (PCDD/PCDF) A PCB PODOBNÝCH DIOXÍNOM

## I. METÓDY ODBERU VZORIEK A INTERPRETÁCIA ANALYTICKÝCH VÝSLEDKOV

## 1. Účel a oblasť

Vzorky určené na úradnú kontrolu obsahu dioxínov (polychlórovaných dibenzo-p-dioxínov (PCDD) a polychlórovaných dibenzofuránov (PCDF)) a dioxínom podobných polychlórovaných bifenylov PCB<sup>(1)</sup> v krmivách sa odoberajú podľa ustanovení prílohy I. V súvislosti s kontrolou látok alebo produktov homogénne rozložených v krmive sa musia uplatniť kvantitatívne požiadavky podľa bodu 5.A prílohy I. Takto získané súhrnné vzorky sa považujú za reprezentatívne pre vzorkované partie alebo vzorkované dielčie partie. Dodržanie najvyšších prípustných množstiev ustanovených v smernici Európskeho parlamentu a Rady 2002/32/ES<sup>(2)</sup> sa zisťuje na základe množstiev stanovených v laboratórnych vzorkách

## 2. Súlad partie alebo dielčej partie so špecifikáciou

Vzorkovaná partia je vyhovujúca, ak výsledok jednej analýzy neprekročí príslušné najvyššie prípustné množstvo stanovené v smernici 2002/32/ES, berúc do úvahy neistotu merania.

Partia je z hľadiska najvyššieho prípustného množstva stanoveného v smernici 2002/32/ES nevyhovujúca, ak horná hodnota<sup>(3)</sup> analytického výsledku potvrdená dvojnásobnou analýzou<sup>(4)</sup> presahuje hodnotu najvyššieho prípustného množstva bez dôvodnej pochybnosti s ohľadom na neistotu merania.

<sup>(1)</sup> Tabuľka TEF [= faktorov toxikologickej ekvivalencie (toxic equivalency factors)] pre dioxíny, furány a dioxínom podobné PCB

Kongenér	Hodnota TEF	Kongenér	Hodnota TEF
<b>Dibenzo-p-dioxíny („PCDDs“)</b>			
2,3,7,8-TCDD	1	„Dioxínom podobné“ PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	<b>neorto PCB</b>	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
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	0,01
OCDD	0,0001	<b>mono-orto PCB</b>	
<b>Dibenzofurány („PCDF“)</b>			
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Použitie skratky: „T“ = tetra, „Pe“ = penta, „Hx“ = „hexa“, „Hp“ = hepta, „O“ = okta, „CDD“ = chlóródibenzo-p-dioxín, „CDF“ = chlóródibenzofurán, „CB“ = chlóróbifenylyl.

<sup>(2)</sup> Ú. v. ES L 140, 30.5.2002, s. 10.

<sup>(3)</sup> Koncept „hornej hodnoty“ si vyžaduje použitie limitu kvantifikácie pre podiel každého nekvantifikovaného kongenera na toxickom ekvivalente (TEQ).

Koncept „dolnej hodnoty“ si vyžaduje použitie nulovej hodnoty pre podiel každého nekvantifikovaného kongenera na toxickom ekvivalente (TEQ).

Koncept „strednej hodnoty“ si vyžaduje použitie polovice limitu kvantifikácie pri výpočte podielu každého nekvantifikovaného kongeneru na TEQ.

<sup>(4)</sup> Dvojnásobná analýza je potrebná na vylúčenie možnosti vnútornej krížovej kontaminácie alebo náhodného pomiešania vzoriek. Prvá analýza, s ohľadom na neistotu merania, sa používa na overenie súladu.

V prípade, že sa analýza vykoná v rámci vyšetrenia incidentu dioxínovej kontaminácie, je možné upustiť od dvojnásobnej analýzy, ak vzorky vybrané na analýzu súvisia s incidentom dioxínovej kontaminácie vzhľadom na ich vysledovateľnosť. V prípade, keď analýza sa vykonáva v rámci vyšetrenia incidentu dioxínovej kontaminácie, je možné upustiť od dvojnásobnej analýzy, ak vzorky vybrané na analýzu súvisia s incidentom dioxínovej kontaminácie vzhľadom na ich vysledovateľnosť.

Meranie neistoty sa môže zohľadniť podľa jedného z nasledujúcich postupov:

- výpočtom rozšírenej neistoty pomocou koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95 % úroveň spoľahlivosti. Partia je nevyhovujúca, ak nameraná hodnota mínus U je vyššia ako najvyššie prípustné množstvo. Pri oddelenom samostatnom stanovení dioxínov a PCB podobných dioxínom sa musí súčet rozšírenej neistoty vypočítanej pre samostatné analytické výsledky pre dioxíny a PCB podobné dioxínom použiť pre súčet dioxínov a PCB podobných dioxínom,
- zavedením rozhodovacieho limitu (CCa) v súlade s rozhodnutím Komisie 2002/657/ES<sup>(1)</sup> (bod 3.1.2.5 prílohy – v prípade látok so zavedenou povolenou hodnotou). Partia nevyhovuje, ak sa nameraná hodnota rovná CCa alebo je od nej vyššia.

Aktuálne pravidlá interpretácie sa vzťahujú na analytický výsledok vzorky určenej na úradnú kontrolu. Týmto nie je ovplyvnené právo členských štátov uplatňovať vnútroštátne predpisy pre analýzy na účely sledovania bezpečnosti alebo rozhodovania.

## II. PRÍPRAVA VZORKY A POŽIADAVKY NA METÓDY ANALÝZY POUŽÍVANÉ PRI ÚRADÝCH KONTROLÁCH OBSAHU DIOXÍNOV (PCDD/PCDF) A DIOXÍNOM PODOBNÝCH PCB.

### 1. Cieľ a oblasť uplatňovania

Tieto požiadavky sa uplatňujú pri analýze kŕmnych surovín a kŕmív na účely stanovenia obsahu dioxínov [polychlóvaných dibenzo-p-dioxínov (PCDD) a polychlóvaných dibenzofuránov (PCDF)] a dioxínom podobných polychlóvaných bifenylov (PCB).

Monitorovanie prítomnosti dioxínov v kŕmivách sa môže vykonať pomocou stratégie, ktorej súčasťou je skríningová metóda, s cieľom vybrať vzorky s obsahom dioxínov a dioxínom podobných PCB v množstve o 25 % nižšom ako je príslušné prípustné množstvo alebo s obsahom vyšším ako je príslušné prípustné množstvo. Koncentráciu dioxínov v tých vzorkách, ktoré obsahujú významné množstvá je potrebné stanoviť/potvrdiť potvrdzujúcou metódou.

Skríningové metódy sú metódy, ktoré sa používajú na zisťovanie prítomnosti dioxínov a PCB podobných dioxínom na úrovni príslušných prípustných množstiev. Týmto metódami možno analyzovať veľké množstvo vzoriek a používajú sa na vytriedenie prípadných pozitívnych vzoriek z veľkého množstva. Sú špeciálne určené na zabránenie falošne negatívnych vzoriek.

Potvrdzujúce metódy sú metódy, ktoré poskytujú úplné alebo doplnujúce informácie, na základe ktorých možno jednoznačne určiť a kvantifikovať dioxíny a PCB podobné dioxínom na úrovni príslušného prípustného množstva.

### 2. Súvislosti

Keďže environmentálne a biologické vzorky (vrátane vzoriek kŕmnych surovín/kŕmív) vo všeobecnosti obsahujú komplexné zmesi rôznych dioxínových kongenéro, vyvinul sa koncept faktorov toxického ekvivalencie (TEF), ktorým sa umožní posúdenie rizika. Tieto TEF sa zaviedli na vyjadrenie koncentrácií zmesí 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF a niektorých neoorto a mono-orto chlóróm substituovaných PCB, ktoré vykazujú účinnosť podobnú dioxínom v toxických ekvivalentoch (TEQ) 2,3,7,8-TCDD. Koncentrácie jednotlivých látok v danej vzorke sa vynásobia ich príslušným TEF a celková koncentrácia zlúčenín podobných dioxínom, vyjadrená v TEQ, sa potom vypočíta ich sčítaním.

Iba na účely tohto nariadenia predstavuje prijatý špecifický limit kvantifikácie individuálneho kongenera koncentráciu analytu v extrakte vzorky, ktorá vytvára inštrumentálnu reakciu na dvoch rôznych iónoch, určených na monitorovanie v pomere signál-šum (S/N) 3: 1 pre menej citlivé signály a pri splnení základných požiadaviek, ako je napr. retenčný čas a pomer izotopu podľa postupu stanovenia popísaného v metóde EPA 1613 revízie B.

### 3. Požiadavky na zabezpečenie kvality, ktoré sa musia splniť pri príprave vzoriek

Uplatňujú sa všeobecné ustanovenia o príprave vzoriek na analýzu stanovené v prílohe II.

Okrem toho musia byť splnené tieto požiadavky:

- vzorky sa musia skladovať a prepravovať v sklenených, hliníkových, polypropylénových alebo polyetylénových nádobách. Z nádoby na vzorky sa musia odstrániť stopové množstvá papierového prachu. Sklenené nádoby treba vypláchnuť rozpúšťadlami, ktoré sa najskôr skontrolujú na prítomnosť dioxínov,

<sup>(1)</sup> Ú. v. ES L 221, 17.8.2002, s. 8.

- vykonaním celého postupu analýzy bez vzorky sa vykonáva slepá skúška,
- hmotnosť vzorky, ktorá sa použije na extrakciu, musí byť postačujúca na to, aby sa splnili požiadavky ohľadne citlivosti.

#### 4. Požiadavky na laboratóriá

- Laboratóriá preukážu, že metódu uskutočnili v rozsahu príslušného prípustného množstva napr. na úrovni 0,5 násobku, 1 násobku a 2 násobku príslušného prípustného množstva s prijateľným variačným koeficientom pre opakovanú analýzu. Kritériá prijateľnosti sú uvedené v bode 5.
- Limit kvantifikácie pre potvrdzujúcu metódu má byť v rozsahu približne jednej pätiny príslušného prípustného množstva, aby sa zabezpečilo dosiahnutie prijateľných variačných koeficientov na úrovni príslušného prípustného množstva.
- Pravidelné slepé kontroly a pokusy na vopred kontaminovaných vzorkách alebo analýza kontrolných vzoriek (ak je to možné, tak najlepšie certifikovaného referenčného materiálu) sa vykonávajú v rámci vnútorných opatrení kontroly kvality.
- Úspešná účasť na medzilaboratórnych štúdiách, v rámci ktorých sa posudzuje odborná spôsobilosť laboratórií, predstavuje najlepší spôsob ako preukázať spôsobilosť pre konkrétne druhy analýzy. Ale ani úspešná účasť v medzilaboratórnych štúdiách, napr. vzoriek pôdy alebo odpadových vôd, však nemusí potvrdiť spôsobilosť aj v oblasti vzoriek potravín alebo krmív, pri ktorých sa vyskytuje nižšia miera kontaminácie. Preto je stále účasť na medzilaboratórnych štúdiách stanovenia dioxínov a PCB podobných dioxínom v príslušných krmivových/potravinových maticiach povinná.
- Laboratóriá akredituje uznávaný orgán, ktorého činnosť sa riadi usmernením 58 ISO, aby sa zabezpečilo, že laboratóriá budú uplatňovať zabezpečovanie kvality analýz. Laboratóriá majú byť akreditované podľa normy ISO/IEC/17025.

#### 5. Požiadavky na analytické postupy u dioxínov a PCB podobných dioxínom

Základné požiadavky na uznanie analytických postupov:

- **Vysoká citlivosť a nízke limity detekcie.** V prípade PCDD a PCDF sa vzhľadom na mimoriadnu toxicitu niektorých zlúčenín detekovateľné množstvo musí nachádzať v pikogramovom rozsahu TEQ ( $10^{-12}$  g). Je známe, že PCB sa vyskytujú vo väčšej koncentrácii ako PCDD a PCDF. V prípade väčšiny kongénrov PCB citlivosť v nanogramovom ( $10^{-9}$  g) rozsahu je už postačujúca. Avšak pri meraní toxickjších kongénrov PCB podobných dioxínom (najmä neorto substituovaných kongénrov) sa musí dosiahnuť rovnaká citlivosť ako u PCDD a PCDF
- **Vysoká selektívnosť (špecifickosť).** Vyžaduje sa rozlíšenie PCDD, PCDF a PCB podobných dioxínom od viacerých iných, spolu vyextrahovaných a prípadne interferujúcich zlúčenín, ktoré sa vyskytujú v rádo vo viacnásobne vyššej koncentrácii ako príslušné analyty. V prípade metód plynovej chromatografie/hmotnostnej spektrometrie (GC/MS) je potrebné rozlíšenie medzi rôznymi kongénrmi, napríklad medzi toxickými (napr. sedemnástimi 2,3,7,8-substituovanými PCDD a PCDF a PCB podobnými dioxínom) a ostatnými kongénrmi. Pomocou biologických analýz sa musia dať selektívne určiť hodnoty TEQ, ako suma PCDD, PCDF a PCB podobných dioxínom.
- **Vysoká správnosť (pravdivosť a presnosť merania).** Stanovenie má zabezpečiť platný a spoľahlivý odhad skutočnej koncentrácie vo vzorke. Vysoká správnosť (správnosť merania: miera zhody medzi výsledkom merania a skutočnou alebo priradenou hodnotou meranej veličiny) je potrebná, aby sa výsledok analýzy vzorky nezamietol kvôli nízkej spoľahlivosti odhadu TEQ. Správnosť sa vyjadruje ako pravdivosť (rozdiel medzi priemernou hodnotou nameranou pre analyt v certifikovanom materiáli a jeho certifikovanou hodnotou, vyjadrenou v percentách tejto hodnoty) a presnosť ( $RSD_R$ , relatívna smerodajná odchýlka vypočítaná z výsledkov dosiahnutých podľa podmienok reprodukovateľnosti).

Skríningové metódy môžu zahŕňať biologické analýzy a metódy GC/MS; potvrdzujúce metódy sú metódy plynovej chromatografie s vysokou rozlíšiteľnosťou alebo metódy hmotnostnej spektrometrie s vysokou rozlíšiteľnosťou (HRGC/HRMS).

Pokiaľ ide o celkovú hodnotu TEQ, musia sa dodržať tieto kritériá:

	Skrínigové metódy	Potvrdzujúce metódy
Miera falošne negatívnych nálezov	< 1 %	
Pravdivosť		- 20 % až + 20 %
Presnosť RSD <sub>R</sub>	< 30 %	< 15 %

## 6. Špecifické požiadavky na metódy GC/MS, ktoré je potrebné splniť na účely skrínigovania a potvrdzovania

- Na validovanie analytického postupu, na samom začiatku analýzy, napríklad pred extrakciou, sa musí pridať <sup>13</sup>C izotopom označený vnútorný štandard 2,3,7,8 – chlóróm substituovaných PCDD/F a <sup>13</sup>C izotopom označený vnútorný štandard PCB podobných dioxínom. Pre každú z tetra až okta-chlórovaných homologických skupín v prípade PCDD/F sa musí pridať aspoň jeden kongenér a aspoň jeden kongenér pre každú z homologických skupín v prípade PCB podobných dioxínom (prípadne aspoň jeden kongenér pre každú hmotnostnou spektrometriou vyselektovanú, ióny zaznamenávajúcu funkciu, ktorá sa použije na kontrolu prítomnosti PCDD/F a PCB podobných dioxínom). V prípade potvrdzujúcich metód sa jednoznačne uprednostňuje použitie všetkých 17 vnútorných štandardov 2,3,7,8-chlórom substituovaných PCDD/F označených izotopom <sup>13</sup>C a všetkých 12 vnútorných štandardov PCB podobných dioxínom označených izotopom <sup>13</sup>C.
- Použitím vhodných kalibračných roztokov sa majú stanoviť pomerné faktory odozvy aj v prípade kongenéro, pri ktorých sa nepridáva žiadny <sup>13</sup>C izotopom označený analóg.
- 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, ktoré obsahujú viac ako 10 % tuku, možno vnútorný štandard pridať buď pred extrakciou, alebo po vyextrahovaní tuku. V závislosti od toho, v ktorej fáze sa vnútorný štandard pridáva, a od toho, či sa udávané výsledky vzťahujú na výrobok alebo na tuk, sa vykoná vhodná validácia účinnosti extrakcie.
- Ešte pred započatím analýzy GC/MS sa musia pridať jeden alebo dva štandardy návratnosti (náhradné).
- Návratnosť je potrebné kontrolovať. V prípade potvrdzujúcich metód sa návratnosť jednotlivých vnútorných štandardov má pohybovať v rozmedzí 60 % až 120 %. Nižšia alebo vyššia miera návratnosti sa u jednotlivých kongenéro, najmä u niektorých hepta- a okta- chlórovaných dibenzodioxínov a dibenzofuránov, pripúšťa za podmienky, že ich podiel na hodnote TEQ nie je väčší ako 10 % z celkovej hodnoty TEQ (vychádzajúcej zo súčtu PCDD/F a PCB podobných dioxínom). V prípade skrínigových metód sa musí návratnosť pohybovať v rozmedzí 30 až 140 %.
- Oddelenie dioxínov od interferujúcich chlórovaných zlúčenín ako sú PCB, ktoré nie sú podobné dioxínom, a chlórované difenylétery sa majú vykonávať vhodnými chromatografickými postupmi (pokiaľ možno na kolóne s florisilom, hliníkom a/alebo uhlíkom).
- Oddelenie izomérov plynovou chromatografiou má byť dostačujúce (< 25 % medzi píkmi 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Stanovenie sa má vykonať podľa metódy EPA 1613, revízia B: tetra- až okta-chlórované dioxíny a furány pomocou izotopového zriadenia HRGC/HRMS alebo inou metódou s porovnateľnými kritériami účinnosti.
- Rozdiel medzi hornou a dolnou hranicou nesmie presiahnuť 20 %, ak ide o krmivá kontaminované dioxínmi v rozsahu okolo najvyššieho prípustného množstva alebo nad ním. Ak ide o krmivá s mierou kontaminácie výrazne nižšou ako najvyšší prípustný obsah, rozdiel sa môže pohybovať v rozsahu 25 % až 40 %.

## 7. Skrínigové metódy analýzy

### 7.1. Úvod

Skrínigové metódy z analytického hľadiska môžu byť: jednoduchý skrínigový postup a kvantitatívny postup.

### Skríningový postup

Odozva na vzorky sa porovnáva s odozvou na referenčné vzorky na príslušnej úrovni. Vzorky s nižšou odozvou, ako je referenčná hodnota sa vyhlásia za negatívne, a vzorky s vyššou odozvou za potenciálne pozitívne. Požiadavky:

- slepá(-é) a referenčná(-é) vzorka(-y) sa musí(-ia) zahrnúť do každej skúšobnej série, ktoré sa extrahujú a skúšajú súčasne za rovnakých podmienok; referenčná vzorka musí vykazovať zjavne zvýšenú odozvu v porovnaní so slepou,
- do analýzy sa majú zahrnúť aj ďalšie referenčné vzorky s obsahom 0,5 násobku a 2 násobku príslušného prípustného množstva, aby sa pri kontrole príslušného prípustného množstva preukázala riadna výkonnosť skúšky v rozsahu príslušného prípustného množstva,
- pri skúšaní iných matric sa musí preukázať vhodnosť referenčnej(-ých) vzorky(-iek), a to najlepšie tak, že sa do analýzy zaradia vzorky, na ktorých sa pomocou HRGC/HRMS preukáže, že obsahujú TEQ približne na úrovni referenčnej vzorky, alebo slepé vzorky vopred kontaminované na tejto úrovni,
- keďže pri biologických analýzach nemožno používať vnútorné štandardy, veľmi dôležité sú skúšky opakovateľnosti, aby sa v rámci jednej skúšobnej série získali údaje o smerodajnej odchýlke. Varičný koeficient musí byť menší ako 30 %,
- pri biologických analýzach sa majú určiť cieľové zlúčeniny, prípadné interferencie a najvyššie prípustné množstvá v slepých vzorkách.

### Kvantitatívny postup

Kvantitatívny postup si vyžaduje série štandardných zriedení, dvojnásobné alebo trojnásobné čistenie a meranie, ako aj slepé vzorky a kontrolné vzorky návratnosti. Výsledok možno vyjadriť ako TEQ, pričom sa predpokladá, že zlúčeniny, ktoré vyvolajú signál, zodpovedajú princípu TEQ. Možno na to použiť TCDD (alebo štandardnú zmes dioxínu/furánu/dioxínu podobných PCB) k zostrojeniu kalibračnej krivky na výpočet hodnoty TEQ v extrakte, a teda aj vo vzorke. Výsledok sa potom upraví, pokiaľ ide o hodnotu TEQ vypočítanej pre slepú vzorku (aby sa zohľadnili nečistoty pochádzajúce z použitých rozpúšťadiel a chemikálií), a návratnosť (vypočítanú z hodnoty TEQ vzorky určenej na kontrolu kvality, ktorá sa pohybuje okolo príslušného prípustného množstva). Najdôležitejšie je uvedomiť si, že zdanlivý úbytok návratnosti môže byť čiastočne spôsobený účinkom matrice a/alebo rozdielmi medzi hodnotami TEF v biologických analýzach a úradnými hodnotami TEF, ktoré stanovila WHO.

#### 7.2. Požiadavky na metódy analýzy, ktoré sa používajú pri skríningu

- Na skríning možno použiť metódy analýzy GC/MS a biologickú analýzu. V prípade metód GC/MS sa uplatnia požiadavky ustanovené v bode 6. V prípade biologických analýz s bunkami sa osobitné požiadavky ustanovujú v bode 7.3 a v prípade biologických analýz s použitím testovacej súpravy v bode 7.4.
- Informácie o počte falošne pozitívnych nálezov a falošne negatívnych nálezov vo veľkom súbore vzoriek, ktoré sa pohybujú pod a nad najvyšším prípustným množstvom alebo pod a nad akčnou hodnotou, sú potrebné na porovnanie s obsahom TEQ, ktorý bol stanovený potvrdzovacou metódou analýzy. Skutočná miera falošne negatívnych výsledkov musí byť nižšia ako 1 %. Miera falošne pozitívnych vzoriek má byť taká nízka, aby sa oplátilo použitie skríningového prístroja.
- Pozitívne nálezy sa vždy musia potvrdiť potvrdzujúcou metódou analýzy (HRGC/HRMS). Okrem toho vzorky nachádzajúce sa v širokom rozsahu TEQ sa majú potvrdiť metódou HRGC/HRMS (približne 2 – 10 % negatívnych vzoriek). Informácie o zhodnosti výsledkov biologickej analýzy s výsledkami HRGC/HRMS majú byť k dispozícii.

#### 7.3. Špecifické požiadavky na bunečnú biologickú analýzu

- Pri biologickej analýze si každý priebeh testovania vyžaduje sériu referenčnej koncentrácie TCDD alebo zmesi dioxínu/furánu (plná krivka odozvy dávke s  $R^2 > 0,95$ ). Avšak na účely skríningu možno na analýzu vzoriek s nízkou odozvou použiť rozšírenú krivku nízkej odozvy.
- Na vykonávanie biologickej analýzy, vždy v rovnakom trvaní, sa používa referenčná koncentrácia TCDD (približne trojnásobok limitu kvantifikácie), ktorá sa uvádza na príslušnom hárku kontroly kvality. Alebo možno odozvu na referenčnú vzorku porovnávať s kalibračnou priamkou TCDD, keďže odozva na bunky môže závisieť od viacerých faktorov.
- Grafy kontroly kvality (QC) každého typu referenčného materiálu sa majú zaznamenávať a kontrolovať, aby sa zabezpečilo, že výsledok bude v súlade s uvádzanými pokynmi.

- Najmä v prípade kvantitatívnych výpočtov indukcia použitého zriadenia vzorky sa musí pohybovať v lineárnej časti krivky odozvy. Vzorky, ktoré sa nachádzajú nad lineárnou časťou krivky odozvy, sa musia rozriediť a opäť preskúšať. Z toho dôvodu sa odporúča, aby sa súčasne preskúšali aspoň tri alebo viac zriadení.
- Smerodajná odchýlka v percentách nesmie byť väčšia ako 15 % pri trojnásobnom stanovení každého zriadenia vzorky a nemá byť väčšia ako 30 % medzi tromi samostatnými skúškami.
- Limit detekcie možno určiť ako trojnásobok smerodajnej odchýlky slepej vzorky alebo odozvy pozadia. Podľa iného postupu možno uplatniť odozvu väčšiu, ako je odozva pozadia (indukčný faktor predstavuje päťnásobok slepej vzorky), vypočítanú na základe kalibračnej krivky za príslušný deň. Limit kvantifikácie možno určiť ako päť až šesťnásobok smerodajnej odchýlky slepej vzorky alebo odozvy pozadia alebo možno použiť odozvu, ktorá je zjavne väčšia ako odozva pozadia (indukčný faktor predstavuje 10 násobok slepej vzorky), vypočítaná na základe kalibračnej krivky za príslušný deň.

#### 7.4. Špecifické požiadavky na biologické analýzy s použitím testovacej súpravy

- Zabezpečiť sa, aby biologické analýzy s použitím testovacej súpravy mali dostatočnú citlivosť a spoľahlivosť, aby sa mohli uplatňovať na krmivá.
- Potrebne je dodržať pokyny výrobcu ohľadne prípravy a analýzy vzorky.
- Testovacie vzorky sa nemajú používať po uplynutí dátumu expirácie.
- Nemajú sa používať materiály alebo súčasti, ktoré sú určené na použitie s inými súpravami.
- Testovacie súpravy sa majú uchovávať v špecifikovanom rozsahu skladovacích teplôt a používať pri špecifikovaných teplotách.
- Limit detekcie sa v prípade imunologických pokusov určuje ako suma priemernej hodnoty a trojnásobku smerodajnej odchýlky, vychádzajúcej z 10 opakovaných analýz slepej vzorky, ktorá sa vydá smernicou lineárnej regresnej rovnice.
- Na laboratórne skúšky sa majú používať referenčné štandardy, aby sa zabezpečilo, že citlivosť na štandard sa bude pohybovať v prijateľnom rozsahu.

#### 8. Podávanie správ o výsledkoch

Pokiaľ to použitý analytický postup umožňuje, analytické výsledky majú zahŕňať množstvá jednotlivých kongenerov PCDD/F a PCB a majú byť uvedené ako dolná, horná a stredná hodnota, aby sa do výsledkov zahrnulo čo najviac informácií, a tak umožnilo interpretovať výsledky v súlade s osobitnými požiadavkami.

Správa má takisto obsahovať údaje o obsahu lipidov vo vzorke, ako aj o metóde, ktorá sa použila na ich extrakciu.

Údaje o návratnosti jednotlivých vnútorných štandardov sa musia poskytnúť v prípade, že návratnosť sa pohybuje mimo rozsahu uvedeného v bode 6, v prípade, že sa prekročí najvyššie prípustné množstvo a v ostatných prípadoch na požiadanie.

Keďže pri rozhodovaní o tom, či vzorka spĺňa požiadavky, sa má zohľadniť neistota merania, má sa aj tento parameter sprístupniť. Preto sa analytické výsledky majú uvádzať ako „ $x \pm U$ “, kde  $x$  je analytický výsledok a  $U$  je rozšírená neistota merania, použitím koeficientu pokrytia v hodnote 2, ktorý zabezpečuje približne 95-percentnú úroveň spoľahlivosti. Pri oddelenom samostatnom stanovení dioxínov a PCB podobných dioxínom sa musí súčet zistených rozšírených neistôt samostatných analytických výsledkov pre dioxíny a PCB podobné dioxínom použiť pre súčet dioxínov a PCB podobných dioxínom.

Ak by sa neistota merania zohľadnila uplatnením CCa (ako je to opísané v I. 2 tejto časti B), tento parameter sa má uvádzať.

## PRÍLOHA VI

## METÓDY ANALÝZY PRI STANOVENÍ ZLOŽIEK ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU NA ÚČELY ÚRADNÝCH KONTROL KRMÍV

## Podmienky mikroskopickej detekcie, identifikácie alebo odhadu zložiek živočíšneho pôvodu v krmivách

## 1. Cieľ a oblasť uplatňovania

Tieto podmienky sa uplatňujú pri zisťovaní zložiek živočíšneho pôvodu (definovaných ako produkty zo spracovania tiel alebo častí tiel cicavcov, hydiny a rýb) v krmivách pomocou mikroskopického skúmania v rámci koordinovaného inšpekčného programu v oblasti výživy zvierat v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004<sup>(1)</sup>. Ak sa metódy v tejto prílohe používajú vo všetkých úradných testoch, môže sa druhý test vykonať aj s použitím odlišnej alebo alternatívnej metódy s cieľom zlepšiť odhalenie určitých druhov živočíšnych zložiek alebo bližšie špecifikovať pôvod živočíšnych zložiek. Pri zisťovaní určitých špeciálnych zložiek živočíšneho pôvodu ako je plazma, alebo kosti v tuku (pozri aj bod 9) je možno používať odlišný postup za predpokladu, že tieto analýzy sa vykonávajú ako doplňujúce k analýzám predpokladaným v koordinovanom inšpekčnom programe.

## 2. Citlivosť

V závislosti od druhu zložiek živočíšneho pôvodu sa dajú odhaliť ich veľmi malé množstvá v krmive (< 0,1 %).

## 3. Podstata metódy

Na identifikáciu sa používa vhodne pripravená reprezentatívna vzorka odobratá v súlade s ustanoveniami prílohy I. Nasledujúci úradný postup je vhodný pre manipuláciu s krmivom s nízkym obsahom vlhkosti. Krmivo s obsahom vlhkosti vyšším ako 14 % sa musí pred manipuláciou vysušiť (zahusťovať). Špeciálne krmivo alebo krmné suroviny (napr. tuky, oleje) vyžadujú osobitnú úpravu (pozri bod 9). Zložky živočíšneho pôvodu sa zisťujú na základe typických, mikroskopicky identifikovateľných vlastností (napr. svalové vlákna a iné časti mäsa, chrupavky, kosti, rohovina, srst, štetiny, krv, perie, vaječné škrupiny, rybie kosti, rybie šupiny). Zisťovanie sa vykonáva tak vo frakcii po preosievaní (6.1), ako aj v koncentrovanom sedimente (6.2) vzorky.

## 4. Chemikálie

## 4.1. Preparačné činidlo

4.1.1. Chloralhydrát (vodný roztok, 60 % w/v)

4.1.2. Lúh (NaOH 2,5 % w/v alebo KOH 2,5 % w/v) pre frakcie po preosievaní

4.1.3. Parafínový olej alebo glycerol (viskozita: 68 – 81) pre mikroskopické pozorovania v sedimente

## 4.2. Preplachovacie činidlá

4.2.1. Alkohol, 96 %

4.2.2. Acetón

## 4.3. Zahusťovacie činidlo

4.3.1. Tetrachlóretylén (hustota 1,62)

<sup>(1)</sup> Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.



- 4.4. Vyfarbovacie činidlá
- 4.4.1. Roztok jódu/jodidu draselného (rozpustíte 2 g jodidu draselného v 100 ml vody a pridajte 1 g jódu pri neustálom pretrepávaní)
- 4.4.2. Alizarínová červeň (zriedíte 2,5 ml 1M kyseliny chlorovodíkovej v 100 ml vody a pridajte 200 mg alizarínovej červene do tohto roztoku)
- 4.4.3. Cystínové činidlo (2 g octanu olovnatého, 10 g NaOH/100 ml H<sub>2</sub>O)
- 4.4.4. Roztok jódu/jodidu draselného (rozpustený v 70 % etanole)
- 4.5. Odfarbovacie činidlo
- 4.5.1. Komerčný roztok chlórnanu sodného (9,6 % aktívneho chlóru)

## 5. Vybavenie a doplnkové príslušenstvo

- 5.1. Analytické váhy (s presnosťou na 0,01 g; na koncentrovaný sediment sa vyžaduje presnosť na 0,001 g)
- 5.2. Vybavenie na mletie (mlynček alebo trecia miska, osobitne pre analyzované krmivo s obsahom > 15 % tuku).
- 5.3. Sito so štvorcovými okami so šírkou ôk najviac 0,50 mm
- 5.4. Oddeľovací lievik alebo kónická sedimentačná kadička
- 5.5. Stereomikroskop (so zväčšením najmenej 40<sup>x</sup>)
- 5.6. Zložený mikroskop (so zväčšením najmenej 400<sup>x</sup>), prechádzajúce svetlo alebo polarizované svetlo
- 5.7. Štandardné laboratórne sklo

Všetky prístroje a pomôcky musia byť starostlivo vyčistené. Oddeľovací lievik a laboratórne sklo treba umývať v umývačke skla. Sitá treba čistiť kefou s pevnými štetinami.

## 6. Postup

Granulované krmivo možno preosiať pred analýzou, ak sa obe frakcie analyzujú ako osobitná vzorka.

Treba upraviť najmenej 50 g vzorky (starostlivo pomlieť vhodným zariadením na mletie (5.2), ak je to potrebné na dosiahnutie vhodnej štruktúry). Z pomletého materiálu sa odoberú dve reprezentatívne vzorky, jedna pre frakciu po preosívaní (najmenej 5 g) (6.1) a jedna pre koncentrovaný sediment (najmenej 5 g) (6.2). Následne na lepšiu identifikáciu možno používať vyfarbovacie činidlá (6.3).

So zámerom určiť druh bielkoviny živočíšneho pôvodu a pôvod častíc možno používať podporný systém rozhodovania, ako je ARIES a zadokumentovať referenčné vzorky.

### 6.1. Identifikácia zložiek živočíšneho pôvodu vo frakciách po preosívaní

Najmenej 5 g vzorky sa preosieva cez sito (5.3) do dvoch frakcií

Sitová(-é) frakcia(-e) s veľkými časticami (alebo reprezentatívna časť frakcie) sa rozprestrí v tenkej vrstve na vhodnú podložku a systematicky preskúma na prítomnosť zložiek živočíšneho pôvodu pod stereomikroskopom (5.5) pri rôznych zväčšeniach.

Podložné sklíčka so sitovou(-ými) frakciou(-ami) s jemnými časticami sa systematicky preskúmajú na prítomnosť zložiek živočíšneho pôvodu pod zloženým mikroskopom (5.6) pri rôznych zväčšeniach.

## 6.2. Identifikácia zložiek živočíšneho pôvodu z koncentrovaného sedimentu

Najmenej 5 g (navážených s presnosťou na 0,01 g) vzorky sa preniesie do oddeľovacieho lievika alebo kónickej sedimentačnej kadičky a pridá sa najmenej 50 ml tetrachlórretylénu (4.3.1). Zmes sa pretrepáva alebo sa opakovane premieša.

- Ak sa používa uzatvorený oddeľovací lievik, sediment sa nechá pred oddelením dostatočnú dobu usadzovať (najmenej tri minúty). Opakovane sa pretrepe a sediment sa nechá znovu usadzovať najmenej tri minúty. Sediment sa opäť oddelí.
- Ak sa používa otvorená kadička, sediment sa nechá usadzovať najmenej päť minút pred jeho oddelením.

Celkový sediment sa vysuší a následne odváži (s presnosťou na 0,001 g). Váženie je potrebné len vtedy, ak sa vyžaduje odhad množstva. Ak sediment obsahuje mnoho veľkých častíc, môže sa preosiať cez sito (5.3) do dvoch frakcií. Suchý sediment sa preskúma na prítomnosť kostných zložiek pod stereomikroskopom (5.5) a pod zloženým mikroskopom (5.6).

## 6.3. Použitie preparačných činidiel a vyfarbovacích činidiel

Mikroskopickú identifikáciu zložiek živočíšneho pôvodu je možné podporiť použitím osobitných preparačných a vyfarbovacích činidiel.

**Chloralhydrát (4.1.1):** pri opatrnom zahrievaní môžu byť bunkové štruktúry zreteľnejšie, pretože zrnká škrobu želatinujú a nežiaduci obsah buniek sa odstráni.

**Lúh (4.1.2):** buď hydroxid sodný alebo hydroxid draselný vyčirí krmivový materiál, ktorý pomáha pri detekcii svalových vlákien, chlupov a iných keratínových štruktúr.

**Parafínový olej alebo glycerol (4.1.3):** v tomto preparačnom činidle sa môžu dobre identifikovať kostné zložky, pretože väčšina dutín zostáva naplnená vzduchom a pôsobí ako približne 5 – 15 µm čierne diery.

**Roztok jódu/jodidu draselného (4.4.1):** používa sa na detekciu škrobu (modrofialovej farby) a bielkoviny (žltoranzovej farby). Roztok možno zriediť podľa potreby.

**Roztok alizarínovej červene (4.4.2):** červené/ružové sfarbenie kostí, rybích kostí a šupín. Pred vysušením sedimentu (pozri oddiel 6.2) sa celkový sediment preniesie do sklenenej skúmavky a premyje dvakrát približne 5 ml alkoholu (4.2.1) (zakaždým sa premieša vírivým pohybom, rozpúšťadlo sa nechá usadzovať asi minútu a vyleje sa). Pred použitím tohto vyfarbovacieho činidla sa sediment odfarbí pridaním najmenej 1 ml roztoku chlórnanu sodného (4.5.1). Nechá sa pôsobiť 10 minút. Skúmavka sa naplní vodou, sediment sa nechá 2 – 3 minúty usadzovať a voda a suspendované častice sa vylejú. Sediment sa vypláchne dvakrát približne 10 ml vody (zakaždým sa premieša vírivým pohybom, nechá sa usadiť a voda sa vyleje). Pridajú sa dve až 10 kvapiek (v závislosti od množstva rezíduí) roztoku alizarínovej červene. Zmes sa pretrepe a o niekoľko sekúnd dôjde k reakcii. Sfarbený sediment sa dvakrát vypláchne približne 5 ml alkoholu (4.2.1) a potom jedenkrát acetónom (4.2.2) (zakaždým sa premieša vírivým pohybom, nechá sa usadiť a voda sa vyleje). Sediment je pripravený na vysušenie.

**Cystínové činidlo (4.4.3):** po opatrnom zahrievaní sa zložky, ktoré obsahujú cystín (srst, perie a pod.) sa sfarbia do čierneho.

## 6.4. Skúmanie krmiva, ktoré pravdepodobne obsahuje rybiu múčku

Preskúma sa najmenej jedno podložné sklíčko pripravené z jemnej sitovej frakcie a z jemnej frakcie sedimentu pod zloženým mikroskopom (pozri časti 6.1 a 6.2).

Ak podľa označenia je medzi zložkami krmiva rybia múčka alebo ide o podozrenie prítomnosti rybej múčky alebo sa jej prítomnosť zistila pri úvodnom preskúmaní, preskúmajú sa najmenej dve ďalšie podložné sklíčka pripravené z jemnej sitovej frakcie pôvodnej vzorky a celková sedimentačná frakcia.

## 7. Výpočet a hodnotenie

Členské štáty zabezpečia, aby sa používali postupy opísané v tomto bode, ak sa uskutočňuje úradná analýza zameraná na odhad množstva (a nie jednoducho na prítomnosť) zložiek živočíšneho pôvodu.

Výpočet sa môže robiť len vtedy, ak zložky živočíšneho pôvodu obsahujú kostné fragmenty.

Kostné fragmenty suchozemských teplokrvných druhov (napr. cicavcov a vtákov) sa dajú odlíšiť od rôznych druhov rybích kostí na podložnom sklíčku mikroskopu pomocou typických dutiniek. Podiel zložiek živočíšneho pôvodu v materiáli vzorky sa odhaduje s ohľadom na:

- odhadovaný podiel (% hmotnosti) kostných fragmentov v koncentrovanom sedimente a
- podiel (% hmotnosti) kostí v zložkách živočíšneho pôvodu.

Odhad musí vychádzať z preskúmania (podľa možnosti) najmenej troch podložných sklíčok a najmenej piatich políčok na každé sklíčko. Koncentrovaný sediment v kýmnych zmesiach spravidla neobsahuje len fragmenty kostí suchozemských zvierat a kostí rýb, ale aj iné častice o vysokej špecifickej hmotnosti, napr. minerály, piesok, fragmenty zdrevnatených rastlín a podobne.

#### 7.1. Odhadovaná hodnota zložiek živočíšneho pôvodu v percentách

% fragmentov kostí suchozemských zvierat =  $(S \times c)/W$

% fragmentov rybích kostí a šupín =  $(S \times d)/W$

[S = hmotnosť sedimentu (mg), c = korekčný faktor (%) odhadovaného množstva kostí suchozemských zvierat v sedimente, d = korekčný faktor (%) odhadovaného množstva rybích kostí a rybích šupín v sedimente, W = hmotnosť vzorky pre sedimentáciu (mg)].

#### 7.2. Odhadovaná hodnota zložiek živočíšneho pôvodu

Podiel kostí sa môže v živočíšnych produktoch významne odlišovať. (Percentuálne zastúpenie kostí, ak ide o kostnú múčku, je spravidla v rozpätí od 50 do 60 %, a ak ide o mäsovú múčku v rozpätí od 20 do 30 %; v rybích múčkach sa množstvo kostí a šupín pohybuje v závislosti od kategórie a pôvodu rybej múčky, bežne v rozpätí od 10 do 20 %).

Ak je druh živočíšnej múčky prítomnej vo vzorke známy, je možné odhadnúť jej množstvo:

odhadované množstvo zložiek z produktov suchozemských zvierat (%) =  $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

odhadované množstvo zložiek z rybích produktov (%) =  $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

[S = hmotnosť sedimentu (mg), c = korekčný faktor (%) odhadovaného množstva kostných zložiek zo suchozemských zvierat v sedimente, d = korekčný faktor (%) odhadovaného množstva rybích kostí a fragmentov šupín v sedimente, f = korekčný faktor podielu kostí v zložke živočíšneho pôvodu v skúmanej vzorke, W = hmotnosť vzorky pre sedimentáciu (mg)].

### 8. Vyjadrenie výsledku skúmania

Správa musí prinajmenej obsahovať informáciu o prítomnosti zložiek pochádzajúcich zo suchozemských zvierat a z rybej múčky. Jednotlivé prípady sa vyjadrujú takto:

#### 8.1. Pokiaľ ide o prítomnosť zložiek pochádzajúcich zo suchozemských zvierat:

- v preskúmanej vzorke neboli nájdené zložky pochádzajúce zo suchozemských zvierat rozoznateľné mikroskopom

alebo

- v preskúmanej vzorke boli nájdené zložky pochádzajúce zo suchozemských zvierat rozoznateľné mikroskopom.

#### 8.2. Pokiaľ ide o prítomnosť rybej múčky:

- v preskúmanej vzorke neboli nájdené žiadne zložky pochádzajúce z rýb rozoznateľné mikroskopom

alebo

- v preskúmanej vzorke boli nájdené zložky pochádzajúce z rýb rozoznateľné mikroskopom.

Ak boli vo vzorke nájdené zložky pochádzajúce z rýb alebo zo suchozemských zvierat, správa o výsledku skúmania, ak sa to požaduje, môže ďalej uvádzať odhad zisteného množstva zložiek (x %, < 0,1 %, 0,1 – 0,5 %, 0,5 – 5 % alebo > 5 %), ďalšiu špecifikáciu zisteného druhu suchozemského zvierťa, ak je to možné, a identifikované zložky živočíšneho pôvodu (svalové vlákna, chrupavky, kosti, rohovina, srst', štetiny, perie, krv, vajecné škrupiny, rybie kosti, rybie šupiny).

Ak sa odhaduje množstvo zložiek živočíšneho pôvodu, treba uvádzať použitý korekčný faktor f.

Ak sa identifikovali kostné zložky zo suchozemských zvierat, správa musí obsahovať doplňujúcu vetu:

„Možnosť, že uvedené zložky pochádzajú z cicavcov, nie je možné vylúčiť.“

Táto doplňujúca veta nie je potrebná, ak kostné fragmenty zo suchozemských zvierat boli špecifikované ako kostné fragmenty z hydiny alebo z cicavcov.

#### 9. **Voliteľný úradný postup pre analýzu tuku alebo oleja**

Pre analýzu tuku alebo oleja sa môže používať nasledovný úradný postup:

- ak je tuk tuhej konzistencie, ohrieva sa napríklad v mikrovlnnej rúre, kým sa neroztopí,
- použitím pipety sa odoberie 40 ml tuku zo spodnej časti vzorky a prenesie sa do odstredivkovej skúmavky,
- odstreďuje sa 10 minút pri otáčkach 4 000 ot/min,
- ak je tuk po odstredení tuhý, ohrieva sa znovu v rúre, kým sa neroztopí; opakujte odstreďovanie 5 minút pri otáčkach 4 000 ot/min,
- použitím malej lyžičky alebo lopatky sa jedna polovica usadených nečistôt prenesie do malej Petriho misky alebo na podložné sklíčko mikroskopu na mikroskopickú identifikáciu možného obsahu zložiek živočíšneho pôvodu (mäsových vlákien, peria, kostných fragmentov). Ako preparačné činidlo pre mikroskopiu sa odporúča parafínový olej alebo glycerol,
- zvyšné nečistoty sa použijú na sedimentáciu, ako je opísané v bode 6.2.

## 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-benzoyloxy-6-butyl-3-metoxycarbonyl-4chinolín***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 dichlórmétánom, s použitím iónovo-výmennnej chromatografie a potom znovu dichlórmétánom. Obsah metylbenzochátu sa stanoví pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou (HPLC) a použitím UV detektora.

**3. Chemikálie****3.1. Dichlórmétán****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 ( $\rho_{20}$  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 opláchnie 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)
- 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). Doplníte 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 C<sub>18</sub> 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. Vykonajte 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) vypustite do 500 ml banky s guľatým dnom. Extrakciu vodnej fázy zopakujte s dvomi ďalšími 40 ml dávkami dichlórmétanu a extrakty spojte v banke s guľatým dnom s prvým extraktom. Extrakt dichlórmétanu 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 sklenej 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. Vytekajúci 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 dvomi 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 dvomi 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.

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.7.3) obsahujúci 4 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky alebo plochy píkovo a konštantné retenčné časy.

##### 5.6.2. *Kalibračná krivka*

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a zmerajte výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky alebo plochy píkovo 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) píkovo priemernú výšku (plochu) píku metylbenzochátu.

#### 6. **Výpočet výsledkov**

Z priemernej výšky (plochy) píkovo 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:

- 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 obyčajne pohybuje okolo 2 nm;
- 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 absorpcie. Táto požiadavka je splnená, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorpcie analytu štandardu;
- 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné rovnaké maximá a keď v žiadnom pozorovanom bode odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorpcie 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 <sub>r</sub> [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Slepá	Múčka 1	Granule 1	Múčka 2	Granule 2
CV <sub>r</sub> [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
s <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV <sub>R</sub> [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
návratnosť [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nezistené

s<sub>r</sub> = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

CV<sub>r</sub> = variačný koeficient opakovateľnosti, %

s<sub>R</sub> = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV<sub>R</sub> = variačný koeficient reprodukovateľnosti, %

## B. STANOVENIE OLACHINDOXU

2-[N-2'-(hydroxyetyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-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.

### 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'-(hydroxyetyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-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 and 20,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.5.2). Doplnite 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 C<sub>18</sub>, 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 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 prístupím 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 Erlenmayerovej banky, pridajte 100 ml metanolu (3.1) a banku položte do ultrazvukového kúpeľa (4.1). Pridajte 410 ml vody a nechajte v ultrazvukovom kúpeľi 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 píkovo a konštantné retenčné časy.

**5.3.2. Kalibračná krivka**

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.5.3) niekoľkokrát a stanovte priemerné výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky (plochy) píkovo 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 píkovo 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:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

kde:

c = koncentrácia olachindoxu v roztoku vzorky (5.2) v µg/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 µg/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 ± 10 % pôvodnej šírky píku olachindoxu neobohateného extraktu vzorky.

#### 7.1.2. Detekcia pomocou detektora diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- 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 ± 2 nm;
- 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorpcie analytu štandardu;
- 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorpcie 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 %.

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 <sub>r</sub> [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S <sub>R</sub> [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV <sub>r</sub> [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV <sub>R</sub> [%]	—	11,1	8,9	8,8
nominálny obsah [mg/kg]	—	15	50	100
návrtnosť %	—	97,3	96,0	95,4

L = počet laboratórií

n = počet jednotlivých hodnôt

S<sub>r</sub> = smerodajná odchýlka opakovateľnosti

S<sub>R</sub> = smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti

CV<sub>r</sub> = variačný koeficient opakovateľnosti

CV<sub>R</sub> = 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-propylpyrimidín-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 katiónov 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 kalibrovanj banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.

- 3.5. Roztok chloristanu sodného,  $c = 1,6 \text{ mol/l}$
- Rozpusťte 224,74 g chloristanu sodného vo vode (3.3) v 1 000 ml odmernej banke, doplňte vodou po značku (3.3) a zamiešajte.
- 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-propyl)pyrimidín-5-yl)metyl]-2-metyl-pyridiniumchlorid 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.

### 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 prístupím 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 vypočítava 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 dihydro- fosforečnanu sodného (3.4) a roztoku chloristanu 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

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tak, že niekoľkokrát nastreknete kalibračný roztok (3.7.3) obsahujúci 1,0 µg/ml, kým nedosiahnete konštantné výšky píkovo a konštantné retenčné časy.

#### 5.3.2. Kalibračná krivka

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.7.3) niekoľkokrát a stanovte priemerné výšky (plochy) píkovo pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku, pričom použite priemerné výšky píkovo (plochy) kalibračných roztokovo 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 píkovo 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 ± 10 % pôvodnej šírky píku amprólia neobohateného extraktu vzorky.

#### 7.1.2. Detekcia pomocou diódového poľa

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- 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 ± 2 nm;
- 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorpcie analytu štandardu;
- 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorpcie 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**

Vykonal 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

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 neoddelí 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 ( $c = 0,02$  mol/l) v kyseline chlorovodíkovej ( $c = 0,1$  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 mol/l, 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  $\mu$ m filter (4,5) a roztok odplyňte (napr. ultrazvukom počas 10 minút).
- 3.11. Štandardná látka  
Čistý karbadox: metyl-3-(2-chinoxalinylmetylén)karbazát N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxid, E 850
- 3.11.1. Zásobný štandardný roztok karbadoxu 100  $\mu$ g/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-acetonitrole (3.5). Po spracovaní ultrazvukom vyrovnajte teplotu roztoku s teplotou miestnosti, doplňte metanol-acetonitrilom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaťte banku hliníkovou fóliou alebo použite nádobu z tmavého skla a uložte do chladničky. Pri teplote  $\leq 4$  °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-acetonitrilom (3.5) po značku a zamiešajte. Obaťte banky hliníkovou fóliou. Jednotlivé roztoky zodpovedajú 2,0, 5,0, 10,0 a 20,0  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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 zátku 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 C<sub>18</sub>, 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

## 5. Postup

*Poznámka:* Karbadox je citlivý na svetlo. Vykonávajte všetky činnosti pri tlmenom svetle alebo používajte nádoby z tmavého skla alebo sklenené 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-acetonitrilom (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 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 zriedovacia 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 C<sub>18</sub>, 10 µm alebo ekvivalentná

Mobilná fáza (3.10): Zmes octanového tlmivého roztoku (3.9) a acetonitrlu (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

Vstrekujte 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.

### 6. **Výpočet výsledkov**

Z priemernej výšky (plochy) píku karbadoxu v roztoku vzorky stanovte koncentráciu karbadoxu v roztoku vzorky v µg/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 µg/ml,  
V<sub>1</sub> = 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 µg/ml,  
V<sub>2</sub> = 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 spektra extraktu vzorky a kalibračného roztoku (3.11.2) obsahujúceho 10,0 µg/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 ± 10 % pôvodnej šírky.

7.1.2. *Detekcia pomocou diódového poľa*

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledujúcich kritérií:

- 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 obvyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm;
- spektra 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorpcie analytu štandardu;
- spektra 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 absorpcie. Toto kritérium je splnené, keď sú prítomné tie isté maximá a keď vo všetkých pozorovaných bodoch nepresiahne odchýlka medzi spektrami 15 % absorpcie 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**

Vykonal 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
$CV_R$ (%)	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

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

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

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

#### POZNÁMKA PRE ČITATEĽA

Inštitúcie rozhodli, že vo svojich dokumentoch už nebudú uvádzať odkazy na posledné zmeny a doplnenia aktov, na ktoré sa odkazuje.

Pokiaľ nie je uvedené inak, odkazy na akty v uverejnených dokumentoch sa vzťahujú na akty v ich platnom znení.