

31998L0064

L 257/14

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

19.9.1998

DIREKTIVA KOMISIJE 98/64/ES**z dne 3. septembra 1998****o uvedbi analitskih metod Skupnosti za določanje vsebnosti aminokislin, surovih olj in masti ter olakvindoksa v krmi in o spremembi Direktive 71/393/EGS****(Besedilo velja za EGP)**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ker je treba za preverjanje teh snovi določiti analitske metode Skupnosti;

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za krmo,

ob upoštevanju Direktive Sveta 70/373/EGS z dne 20. julija 1970 o uvedbi metod vzorčenja in analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ⁽¹⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Aktom o pristopu Avstrije, Finske in Švedske, in zlasti člena 2 Direktive,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

ker Direktiva 70/373/EGS določa, da se mora uradni nadzor krme za preverjanje skladnosti z zahtevami, ki jih določajo zakoni in drugi predpisi, glede njihove kakovosti in sestave, izvajati z metodami Skupnosti, določenimi za jemanje vzorcev in analizo;

Člen 1

ker Direktiva Sveta 79/373/EGS z dne 2. aprila 1979 o trženju krmnih mešanic ⁽²⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 97/47/ES ⁽³⁾, in Direktiva Sveta 93/74/EGS z dne 13. septembra 1993 o krmi, namenjeni za posebne prehrabne namene ⁽⁴⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 96/25/ES ⁽⁵⁾, določata da morajo biti aminokisline, surova olja in masti navedene na oznaki krme;

Države članice zagotovijo, da se analize, ki se izvajajo zaradi uradnega nadzora vsebnosti aminokislin, surovih olj in masti ter vsebnosti olakvindoksa v krmi, izvajajo z metodami, določenimi v Prilogi k tej direktivi.

Člen 2

ker Direktiva Sveta 70/524/EGS z dne 23. novembra 1970 o dodatkih v krmi ⁽⁶⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 98/19/ES ⁽⁷⁾, določa da mora biti vsebnost olakvindoksa, če je ta snov dodana krmnim mešanicam, navedena na oznaki;

V Prilogi k Direktivi Komisije 71/393/EGS se točka „4. Določanje surovih olj in masti“ nadomesti z delom B Priloge k tej direktivi.

Člen 3

ker druga Direktiva Komisije 71/393/EGS z dne 18. novembra 1971 o uvedbi analitskih metod Skupnosti za uradni nadzor krme ⁽⁸⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Komisije 84/4/EGS ⁽⁹⁾, med drugim določa tudi analitske metode za določanje vsebnosti surovih olj in masti; ker je primerno opisano metodo spremeniti;

1. Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 31. decembra 1998. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Ti predpisi se uporabljajo od 1. januarja 1999.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicovanja določijo države članice.

⁽¹⁾ UL L 170, 3.8.1970, str. 2.

⁽²⁾ UL L 86, 6.4.1979, str. 30.

⁽³⁾ UL L 211, 5.8.1997, str. 45.

⁽⁴⁾ UL L 237, 22.9.1993, str. 23.

⁽⁵⁾ UL L 125, 23.5.1996, str. 35.

⁽⁶⁾ UL L 270, 14.12.1970, str. 1.

⁽⁷⁾ UL L 96, 28.3.1998, str. 39.

⁽⁸⁾ UL L 279, 20.12.1971, str. 7.

⁽⁹⁾ UL L 15, 18.1.1984, str. 28.

2. Države članice predložijo Komisiji besedila temeljnih predpisov nacionalne zakonodaje, sprejetih na področju, ki ga ureja ta direktiva.

Člen 5

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 3. septembra 1998

Člen 4

Ta direktiva začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Za Komisijo

Franz FISCHLER

Član Komisije

PRILOGA

DEL A

DOLOČANJE AMINOKISLIN

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje prostih (sintetičnih in naravnih) in celotnih (vezanih s peptidi in prostih) aminokislin v krmi z uporabo analizatorja aminokislin. Uporabna je za naslednje aminokisline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, aspartično kislino, glutaminsko kislino, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin in valin.

Metoda ne loči med solmi aminokislin in ne razlikuje aminokislin oblik D in L. Metoda ne velja za določanje triptofana ali hidroksi-analogov aminokislin.

2. Princip

2.1 Proste aminokisline

Proste aminokisline ekstrahiramo z razredčeno klorovodikovo kislino. Soekstrahirane dušikove makromolekule oborimo s sulfosalicilno kislino in odstranimo s filtriranjem. Vrednost pH prefiltrirane raztopine naravnamo na 2,20. Aminokisline ločimo z ionsko izmenjevalno kromatografijo in določimo z reakcijo z ninhidrinom fotometrično z detekcijo pri 570 nm.

2.2 Celotne aminokisline

Postopek izberemo glede na preiskovane aminokisline. Cist(e)in in metionin moramo pred hidrolizo oksidirati v cisteinsko kislino oziroma metionin-sulfonat. Tirozin moramo določiti v hidrolizatih neoksidiranih vzorcev. Vse druge aminokisline, navedene v odstavku 1, lahko določamo v oksidiranem ali neoksidiranem vzorcu.

Oksidacijo izvedemo pri temperaturi 0 °C z mešanico kisline in fenola. Presežek oksidacijskega reagenta razgradimo z natrijevim disulfitom. Oksidiran ali neoksidiran vzorec 23 ur hidroliziramo s klorovodikovo kislino ($c = 6 \text{ mol/l}$). Vrednost pH hidrolizata naravnamo na 2,20. Aminokisline ločimo z ionsko izmenjevalno kromatografijo in določimo z reakcijo z ninhidrinom fotometrično z detekcijo pri 570 nm (440 nm za prolin).

3. Reagenti

Uporabljati moramo dvojno destilirano vodo ali vodo enakovredne kakovosti (prevodnost $< 10 \mu\text{S}$).

3.1 Vodikov peroksid, $w = 30 \%$.

3.2 Mravljinčna kislina, $w = 98\text{--}100 \%$.

3.3 Fenol.

3.4 Natrijev disulfit.

3.5 Natrijev hidroksid.

3.6 5-sulfosalicilna kislina dihidrat.

3.7 Klorovodikova kislina, gostota približno 1,18 g/ml.

3.8 Trinatrijev citrat dihidrat.

3.9 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).

3.10 Natrijev klorid.

3.11 Ninhidrin.

3.12 Petroleter, vrelišče 40–60 °C.

3.13 Norleucin ali druga spojina, primerna za uporabo kot interni standard.

3.14 Dušik ($< 10 \text{ ppm}$ kisika).

- 3.15 1-oktanol.
- 3.16 Aminokislina.
- 3.16.1 Standardne substance, navedene v odstavku 1. Čiste spojine, ki ne vsebujejo kristalne vode. Pred uporabo jih teden dni sušimo v vakuumu nad P_2O_5 ali H_2SO_4 .
- 3.16.2 Cisteinska kislina.
- 3.16.3 Metionin-sulfon.
- 3.17 Raztopina natrijevega hidroksida, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
V vodi raztopimo 300 g NaOH (3.5) in dopolnimo do 1 litra.
- 3.18 Raztopina natrijevega hidroksida, $c = 1 \text{ mol/l}$:
V vodi raztopimo 40 g NaOH (3.5) in dopolnimo do 1 litra.
- 3.19 Raztopina mravljinčne kisline in fenola:
Zmešamo 889 g mravljinčne kisline (3.2) s 111 g vode in dodamo 4,73 g fenola (3.3).
- 3.20 Mešanica za hidrolizo, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, ki vsebuje 1 g fenola/l:
V 492 ml HCl (3.7) dodamo 1 g fenola (3.3) in dopolnimo z vodo do 1 litra.
- 3.21 Mešanica za ekstrakcijo, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, ki vsebuje 2 % tiodiglikola:
8,2 ml HCl (3.7) razredčimo s približno 900 ml vode, dodamo 20 ml tiodiglikola (3.9) in dopolnimo z vodo do 1 litra (ne smemo mešati 3.7 in 3.9 direktno).
- 3.22 5-sulfosalicilna kislina, $\beta = 6 \text{ \%}$:
V vodi raztopimo 60 g 5-sulfosalicilne kisline (3.6) in dopolnimo z vodo do 1 litra.
- 3.23 Mešanica za oksidacijo (permrvljinčna kislina-fenol):
V majhni čaši zmešamo 0,5 ml vodikovega peroksida (3.1) s 4,5 ml raztopine mravljinčne kisline in fenola (3.19). Inkubiramo 1 uro pri temperaturi 20–30 °C, da se ustvari permrvljinčna kislina, nato pa jo, preden jo dodamo vzorcu, (15 min) hladimo v ledeno mrzli vodni kopeli.
Opozorilo: Mešanica ne sme priti v stik s kožo in pri delu moramo uporabljati zaščitne rokavice.
- 3.24 Citratni pufer, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/l$, pH 2,20:
V približno 800 ml vode raztopimo 19,61 g natrijevega citrata (3.8), 5 ml tiodiglikola (3.9), 1 g fenola (3.3) in 16,50 ml HCl (3.7). Vrednost pH raztopine naravnamo na 2,20. Dopolnimo z vodo do 1 litra.
- 3.25 Pufri za eluiranje, pripravljeni v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (4.9).
- 3.26 Reagent ninhidrin, pripravljen v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (4.9).
- 3.27 Standardne raztopine aminokislin. Te raztopine hranimo pri temperaturi pod 5 °C.
- 3.27.1 Osnovne standardne raztopine aminokislin (3.16.1). $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ vsake v klorovodikovi kislini. Lahko komercialne.
- 3.27.2 Osnovne standardne raztopine cisteinske kisline in metionin-sulfona, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
V litrski merilni bučki raztopimo 0,2115 g cisteinske kisline (3.16.2) in 0,2265 g metionin-sulfona (3.16.3) v citratnem pufru (3.24) in dopolnimo s citratnim pufrom do oznake. Hranimo pri temperaturi pod 5 °C največ 12 mesecev. Ta raztopina se ne uporablja, če osnovna standardna raztopina (3.27.1) vsebuje cisteinsko kislino in metionin-sulfon.
- 3.27.3 Osnovna standardna raztopina internega standarda, npr. norleucin, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$.
V merilni bučki raztopimo 0,6560 g norleucina (3.13) v citratnem pufru (3.24) in dopolnimo s citratnim pufrom do 250 ml. Hranimo pri temperaturi pod 5 °C največ 6 mesecev.
- 3.27.4 Standardne raztopine aminokislin za umeritev za uporabo s hidrolizati, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ cisteinske kisline in metionin-sulfona in $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ drugih aminokislin.

V 100-mililitrski čaši raztopimo 2,2 g natrijevega klorida (3.10) v 30 ml citratnega pufra (3.24). Dodamo 4,00 ml osnovne standardne raztopine aminokislin (3.27.1), 4,00 ml osnovne standardne raztopine cisteinske kisline in metonin-sulfona (3.27.2) in 0,50 ml osnovne standardne raztopine internega standarda (3.27.3), če ga uporabimo. Z natrijevim hidroksidom (3.18) naravnamo vrednost pH na 2,20.

Kvantitativno prenesemo v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo s citratnim pufrom do oznake in premešamo.

Hranimo pri temperaturi pod 5 °C največ 3 mesece.

Glejte tudi opombe v 9.1.

- 3.27.5 Standardna raztopina aminokislin za umeritev za uporabo s hidrolizati, pripravljena skladno s 5.3.3.1, in za uporabo z ekstrakti (5.2). Raztopino za umeritev pripravimo skladno s 3.27.4, vendar brez natrijevega klorida.

Hranimo pri temperaturi pod 5 °C največ 3 mesece.

4. Oprema

- 4.1 100-mililitrska ali 250-mililitrska bučka z okroglim dnom, opremljena s povratnim hladilnikom.
- 4.2 100-mililitrska posoda iz borosilikatnega stekla s pokrovom z navojem in gumijasto/teflonsko podlogo (npr. Duran, Schott) za uporabo v sušilniku.
- 4.3 Sušilnik z intenzivnim prepihanjem in termostatom s točnostjo, ki presega ± 2 °C.
- 4.4 pH meter (tri decimalna mesta).
- 4.5 Membranski filter (0,2 μ m).
- 4.6 Centrifuga.
- 4.7 Rotacijski vakuumski uparjalnik.
- 4.8 Mehanski stresalnik ali magnetno mešalo.
- 4.9 Analizator aminokislin ali oprema HPCL z ionsko izmenjevalno kolono, napravo za ninhidrin, postkolonsko derivatizacijo in fotometričnim detektorjem.

Kolono napolnimo s sulfonirano polistirensko smolo, sposobno medsebojnega ločenja aminokislin in ločenja le-teh od drugih ninhidrinsko pozitivnih snovi. Pretok na liniji pufra in na liniji z ninhidrinom zagotavljajo črpalke s stabilnostjo pretoka $\pm 0,5$ % v času, ki zajema tako tok standarda za umeritev kot tudi tok analiziranega vzorca.

Pri nekaterih analizatorjih aminokislin lahko uporabimo postopke hidrolize, pri katerih ima hidrolizat koncentracijo natrija $c = 0,8$ mol/l in vsebuje vso pri oksidaciji preostalo mravljinčno kislino. Drugi analizatorji ne ločujejo zadovoljivo določenih aminokislin, če vsebuje hidrolizat presežek mravljinčne kisline in/ali visoke koncentracije natrijevih ionov. V takem primeru se po hidrolizi in pred naravnanjem pH volumen kisline zmanjša z uparjevanjem na približno 5 ml. Uparjevanje izvedemo pod vakuumom pri največ 40 °C.

5. Postopek

5.1 Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo tako, da preide skozi 0,5-milimetrsko sito. Vzorce z visoko vsebnostjo vlage moramo pred drobljenjem sušiti na zraku pri temperaturi, ki ne presega 50 °C, ali pa jih posušimo z zmrzovanjem. Vzorce z visoko vsebnostjo masti pred drobljenjem ekstrahiramo s petroletrom (3.12).

5.2 Določanje prostih aminokislin v krmi in premiksih

Ustrezno količino (1–5 g) pripravljenega vzorca (5.1) natehtamo s točnostjo 0,2 mg, prenesemo v erlenmajerico in dodamo 100,0 ml mešanice za ekstrakcijo (3.21). Mešanico 60 minut stresamo z mehanskim stresalnikom ali magnetnim mešalom (4.8). Počakamo, da se sediment obori in s pipeto prenesemo 10,0 ml bistre raztopine nad oborino v 100-mililitrsko čašo.

Med mešanjem dodamo 5,0 ml raztopine sulfosalicilne kisline (3.22), nato še 5 minut mešamo z magnetnim mešalom. Filtriramo ali centrifugiramo raztopino, da odstranimo morebitne ostanke oborine. 10,0 ml tako dobljene raztopine prenesemo v 100-mililitrsko čašo in naravnomo vrednost pH na 2,20 s pomočjo raztopine natrijevega hidroksida (3.18). S pomočjo citratnega pufru (3.24) prenesemo raztopino v ustrezno veliko merilno bučko in s pufrsko raztopino dopolnimo do oznake (3.24).

Če uporabljamo interni standard, dodamo 1,00 ml internega standarda (3.27.3) na vsakih 100 ml končne raztopine, nato pa do oznake dopolnimo s pufrsko raztopino (3.24).

Nadaljujemo kromatografijo v skladu s 5.4.

Če ekstraktov ne analiziramo istega dne, jih hranimo pri temperaturi pod 5 °C.

5.3 Določanje celotnih aminokislin

5.3.1 Oksidacija

S točnostjo 0,2 mg natehtamo od 0,1 do 1 g pripravljenega vzorca (5.1) v:

- 100-mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1) za odprto hidrolizo (5.3.2.3) ali,
- 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1), če se zahteva nizka koncentracija natrija (5.3.3.1), ali
- 100-mililitrsko posodo, opremljeno z zamaškom na navoj (4.2), (za zaprto hidrolizo 5.3.2.4).

Natehtani del vzorca naj vsebuje približno 10 mg dušika, vsebnost vlage pa naj ne bo višja od 100 mg.

Bučko/steklenico postavimo v ledeno vodno kopel in jo ohladimo na 0 °C, dodamo 5 ml mešanice za oksidacijo (3.23) ter premešamo s stekleno spatulo z ukrivljenim koncem. Bučko/steklenico skupaj s spatulo nepredušno zapremo s trakom, ledeno vodno kopel, v kateri je zaprta posoda, postavimo v hladilnik s temperaturo 0 °C in pustimo stati 16 ur. Po 16 urah jo vzamemo iz hladilnika in razkrojimo presežek reagenta za oksidacijo z dodatkom 0,84 g natrijevega disulfita (3.4).

Nadaljujemo 5.3.2.1.

5.3.2 Hidroliza

5.3.2.1 Hidroliza oksidiranih vzorcev

Oksidiranemu vzorcu, pripravljenemu skladno s 5.3.1, dodamo 25 ml mešanice za hidrolizo (3.20), pri čemer pazimo, da speremo vse ostanke vzorca s stene posode in s spatule. Odvisno od uporabljenega postopka hidrolize nadaljujemo 5.3.2.3 ali 5.3.2.4.

5.3.2.2 Hidroliza neoksidiranih vzorcev

V 100- ali 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1) ali v 100-mililitrsko posodo s pokrovom z navojem (4.2) natehtamo od 0,1 do 1 g pripravljenega vzorca (5.1) s točnostjo 0,2 mg. Natehtani del vzorca naj vsebuje približno 10 mg dušika. Previdno dodamo 25 ml mešanice za hidrolizo (3.20) in jo primešamo vzorcu. Nadaljujemo postopek skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4.

5.3.2.3 Odprta hidroliza

Mešanici v bučki (pripravljene v skladu s 5.3.2.1 ali 5.3.2.2) dodamo 3 steklene kroglice in pod povratnim hladilnikom pustimo vreti 23 ur, tako da se stalno razvijajo mehurčki. Po končani hidrolizi speremo hladilnik s 5 ml citratnega pufru (3.24). Ločimo bučko in jo ohladimo v ledeni vodni kopeli. Nadaljujemo skladno s 5.3.3.

5.3.2.4 Zaprta hidroliza

Posodo z mešanico, pripravljeno skladno s 5.3.2.1 ali 5.3.2.2, prenesemo v sušilnik (4.3) s temperaturo 110 °C. Med prvo uro, da bi preprečili nastanek tlaka (zaradi razvijanja plinastih substanc) in da bi preprečili eksplozijo, položimo pokrov z navojem na vrh posode. *Posode ne zapremo s pokrovom.* Po eni uri zapremo posodo s pokrovom in pustimo v sušilniku (4.3) 23 ur. Po končani hidrolizi odstranimo posodo iz sušilnika, previdno odvijemo pokrov in posodo postavimo v ledeno kopel. Pustimo, da se ohladi.

Odvisno od postopka naravnavanja vrednosti pH (5.3.3) s citratnim pufrom kvantitativno prenesemo vsebino iz posode v 250-mililitrsko čašo ali 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom (3.24).

Nadaljujemo skladno s 5.3.3.

5.3.3 Naravnavanje vrednosti pH

pH vrednost naravnomo v skladu s 5.3.3.1 ali 5.3.3.2, odvisno od odpornosti aminoanalizatorja (4.9) na natrij.

5.3.3.1 Za kromatografske sisteme (4.9), ki zahtevajo nizko koncentracijo natrija:

Če uporabljamo analizatorje aminokislin, ki zahtevajo nizko koncentracijo natrija (če moramo zmanjšati volumen kisline), je priporočljivo, da uporabimo osnovno raztopino internega standarda (3.27.3).

V tem primeru dodamo hidrolizatu pred uprejanjem 2,00 ml osnovne raztopine internega standarda (3.27.3).

Hidrolizatu, dobljenem skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4, dodamo 2 kapljici 1-oktanolu (3.15).

Z rotacijskim uparjalnikom (4.7) pod vakuumom pri 40 °C zmanjšamo volumen na 5–10 ml. Če se volumen po naključju zmanjša pod 5 ml, moramo hidrolizat zavreči in analizo ponoviti.

Z raztopino natrijevega hidroksida (3.18) naravnamo pH na 2,20 in nadaljujemo 5.3.4.

5.3.3.2 Za vse druge analizatorje aminokislin (4.9)

Hidrolizat, dobljen skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4 delno nevtraliziramo tako, da med mešanjem previdno dodamo 17 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.17). Temperatura mora biti pri tem postopku nižja od 40 °C.

pH vrednost naravnamo na 2,20 pri sobni temperaturi z raztopino natrijevega hidroksida (3.17) in nato z raztopino natrijevega hidroksida (3.18). Nadaljujemo 5.3.4.

5.3.4 Raztopina vzorca za kromatografijo

Hidrolizat, ki smo mu naravnali pH (5.3.3.1 ali 5.3.3.2), kvantitativno prenesemo s citratnim pufrom (3.24) v 200-mililitrsko merilno bučko in jo s pufrom (3.24) dopolnimo do oznake.

Če internega standarda še nismo uporabili, dodamo 2,00 ml internega standarda (3.27.3) in s citratnim pufrom (3.24) dopolnimo do oznake. Temeljito premešamo.

Nadaljujemo kromatografijo (5.4).

Če vzorčnih raztopin ne analiziramo istega dne, jih hranimo pri temperaturi pod 5 °C.

5.4 Kromatografija

Pred kromatografiranjem ekstrakt (5.2) ali hidrolizat (5.3.4) segrejemo na sobno temperaturo. Mešanico pretresemo in filtriramo ustrezno množino skozi 0,2 µm membranski filter (4.5). Dobljeno bistro raztopino podvržemo ionsko izmenjevalni kromatografiji v analizatorju aminokislin (4.9).

Vbrizganje lahko izvedemo ročno ali avtomatsko. Pomembno je, da tako za analizo standardov kot tudi za analizo vzorcev dodamo v kolono enako količino raztopine ± 0,5 %, razen če uporabimo interni standard, ter da je razmerje natrij:aminokislina v raztopini standarda in raztopini vzorca čim bolj podobno.

Na splošno je pogostost izvedbe umeritve odvisna od stabilnosti ninhidrinskega reagenta in analiznega sistema. Standard ali vzorec razredčimo s citratnim pufrom (3.24), da dobimo površino vrha standarda velikosti 30–200 % površine vrha aminokislin iz vzorca.

Kromatografija aminokislin se glede na uporabljen vrsto analizatorja in umetne smole malenkostno razlikuje. Izbrani sistem mora biti zmožen medsebojno ločiti aminokislina in od drugih ninhidrinsko pozitivnih snovi. V delovnem območju se mora kromatografski sistem linearno odzivati na spremembe množin aminokislin, dodanih v kolono.

Pri kromatografiranju se pri analizi ekvimolarne raztopine (aminokislin, ki se določajo) uporablja spodaj navedeno razmerje bazna črta: višina vrha. Ta ekvimolarna raztopina mora vsebovati najmanj 30 % največje količine vsake aminokislina, ki jo je mogoče točno izmeriti s sistemom analizatorja aminokislin (4.9).

Za ločevanje treonin-serina razmerje bazna črta:višina vrha nižje od dveh prekrivajočih se aminokislin na kromatogramu ne sme presegati 2:10 (če določamo samo cist(e)in, metionin, treonin in lizin, bo nezadostno ločenje od pripadajočih vrhov škodljivo vplivalo na določanje). Za vse druge aminokislina mora biti ločenje boljše kot 1:10.

Sistem mora zagotoviti, da se lizin loči od „lizijskih artefaktov“ in orintina.

6. Izračun rezultatov

Površine vrhov vzorca in vrhov standarda izmerimo za vsako aminokislino posebej, nato pa izračunamo množino v g aminokislina na kg vzorca.

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminokislina na kg vzorca}$$

Če smo uporabili interni standard, pomnožimo z: $\frac{D}{C}$

A = površina vrha, hidrolizat ali ekstrakt

B = površina vrha, standardna raztopina za umeritev

C = površina vrha, interni standard v hidrolizatu ali ekstraktu

D = površina vrha, interni standard, standardna raztopina za umeritev

MW = molekulska masa aminokislina, ki jo določamo

E = koncentracija standarda v $\mu\text{mol/ml}$

W = masa vzorca (g) (korigirana glede na začetno maso, če smo sušili ali razmastili)

F = ml celotnega hidrolizata (5.3.4) ali mililitri izračunanega celotnega razredčenja volumna ekstrakta (6.1).

Cistin in cistein določimo skupaj kot cisteinsko kislino v hidrolizatih oksidiranega vzorca, vendar ga izračunamo kot cistin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30 z uporabo molske mase 120,15 (= $0,5 \times 240,30$)).

Metionin določimo kot metionin-sulfon v hidrolizatu oksidiranega vzorca, vendar ga izračunamo kot metionin z uporabo molske mase metionina: 149,21.

Dodani prosti metionin določimo po ekstrakciji kot metionin, za izračun uporabimo isto molsko maso.

6.1 Celotni volumen razredčitve ekstraktov (F) za določanje prostih aminokislin (5.2) izračunamo:

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

V = volumen končnega ekstrakta

7. Ovrednotenje metode

Metoda je bila preskušena v medlaboratorijski primerjavi, ki je bila izvedena leta 1990 na mednarodni ravni, in sicer s štirimi različnimi vrstami krme (mešana prašičja krma, mešanica za piščance, beljakovinski koncentrat, premiks). Rezultati po odstranitvi ubežnikov, ki prikazujejo srednje vrednosti in standardni odmik, so prikazani v spodnji tabeli:

Srednje vrednosti v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Mešanica za piščance	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinski koncentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = število sodelujočih laboratorijev

7.1 Ponovljivost

Ponovljivost, izražena kot „standardni odmik znotraj laboratorija“ iz zgoraj navedene medlaboratorijske primerjave, je v spodnjih tabelah:

Standardni odmik znotraj laboratorija (S_p) v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Mešanica za piščance	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinski koncentrat	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiks	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = število sodelujočih laboratorijev

Koeficient variacije (%) za standardni odmik znotraj laboratorija (S_p)

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Mešanica za piščance	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinski koncentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = število sodelujočih laboratorijev

7.2 Obnovljivost

Rezultati za standardni odmik med laboratoriji pri zgoraj navedeni medlaboratorijski primerjavi so v spodnji tabeli:

Standardni odmik med laboratoriji (S_R) v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Mešanica za piščance	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinski koncentrat	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiks	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = število sodelujočih laboratorijev

Koeficient variacije (%) za standardni odmik med laboratoriji (S_R)

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Mešanica za piščance	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinski koncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = število sodelujočih laboratorijev

8. Uporaba referenčnih materialov

Pravilno uporabo metode preverjamo z izvajanjem vzporednih meritev certificiranih referenčnih materialov, če so na voljo. Priporočljivo je umerjanje s certificirano raztopino aminokislina za umerjanje.

9. Opombe

- 9.1 Zaradi razlik med analizatorji aminokislin upoštevamo končne koncentracije raztopin za umerjanje standardnih aminokislin (glej 3.27.4 in 3.27.5) in hidrolizata (glej 5.3.4) kot vodila.

Za vse aminokislina moramo preveriti območje linearnega odziva opreme.

Standardno raztopino razredčimo s citratnim pufrom, da dobimo površine vrhov na sredini območja.

- 9.2 Če za analizo hidrolizatov uporabljamo opremo za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, moramo eksperimentalne pogoje optimizirati v skladu s priporočili proizvajalca.
- 9.3 Pri uporabi metode za krmo, ki vsebuje več kot 1 % klorida (koncentrat, mineralna krma, nadomestna krma), se lahko pojavi prenizka vrednost vsebnosti metionina in je zato potrebna posebna obdelava.

DEL B

DOLOČANJE SUROVIH OLJ IN MASTI

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda je namenjena določanju vsebnosti surovih olj in masti v krmi. Ne zajema analize oljnih semen in oljnatih sadežev, opredeljenih v Uredbi Sveta 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966.

Uporaba spodaj opisanih postopkov je odvisna od vrste in sestave krme in od namena izvajanja analize.

1.1 Postopek A – Surova olja in masti, ki se ekstrahirajo direktno

Ta metoda je uporabna za krmo rastlinskega izvora, razen tiste, ki je zajeta v področju uporabe postopka B.

1.2 Postopek B – Celotna surova olja in masti

Ta metoda je uporabna za krmo živalskega izvora in za vse krmne mešanice. Uporabljati se mora za vso krmo, iz katere ni mogoče povsem ekstrahirati olj in masti brez predhodne hidrolize (npr. gluteni, kvas, krompirjeve beljakovine in izdelki, podrejeni postopkom, kakor so izrivanje, kosmičenje in segrevanje).

1.3 Interpretacija rezultatov

V vseh primerih, kadar je rezultat po postopku B višji od rezultata po postopku A, se mora rezultat, dobljen po postopku B, sprejeti kot prava vrednost.

2. Princip

2.1 Postopek A

Vzorec ekstrahiramo s petroletrom. Topilo oddestiliramo, preostanek pa osušimo in stehtamo.

2.2 Postopek B

Vzorec med segrevanjem obdelamo s klorovodikovo kislino. Mešanico ohladimo in prefiltriramo. Ostanek speremo in osušimo ter izvedemo določanje v skladu s postopkom A.

3. Reagenti

3.1 Petroleter, vrelišče: 40 do 60 °C. Bromno število mora biti nižje od 1 in ostanek pri izparevanju nižji od 2 mg/100 ml.

3.2 Natrijev sulfat, brezvodni.

3.3 Klorovodikova kislina, $c = 3 \text{ mol HCl/l}$

3.4 Filtracijski pripomoček, npr. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Oprema

4.1 Aparatura za ekstrakcijo. Če je opremljena s sifonom (Soxhlet aparat), mora biti hitrost povratnega toka takšna, da nastane približno 10 ciklov na uro; če nima sifona, mora biti hitrost povratnega toka približno 10 ml na minuto.

4.2 Kartuše za ekstrakcijo, ki ne vsebujejo materialov, topnih v petroletru in s poroznostjo, ki je skladna z zahtevami iz 4.1.

4.3 Sušilnik, vakuumski, nastavljen na $75 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$, ali zračni, nastavljen na $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

5. Postopek

5.1 Postopek A (glej 8.1)

Natehnamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg, prenesemo v kartušo za ekstrakcijo in pokrijemo s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščobe.

Kartušo postavimo v ekstraktor (4.1) in ekstrahiramo šest ur s petroletrom (3.1). Ekstrakt lovimo v suho stehtano bučko, v kateri so delci plovca ⁽¹⁾.

Oddestiliramo topilo. Ostanek osušimo tako, da bučko za uro in pol postavimo v sušilnik (4.3). Pustimo, da se ohladi v eksikatorju in stehtamo. Ponovno sušimo 30 minut do konstantne mase olj in masti (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema mora biti manjša od 1 mg).

5.2 Postopek B

2,5 g vzorca natehnamo s točnostjo 1 mg (glej 8.2) v 400-mililitrsko čašo ali 300-mililitrsko erlenmajerico in dodamo 100 ml klorovodikove kisline (3.3) ter delce plovca. Čašo pokrijemo z urnim steklom ali erlenmajerico spojimo s povratnim hladilnikom. Pri nizkem plamenu ali na električnem kuhalniku mešanico počasi zavremo in jo pustimo rahlo vreti eno uro. Mešanica se ne sme prijemati sten posode.

Ohladimo in dodamo toliko filtracijskega pripomočka (3.4), kot je potrebno, da se prepreči kakršna koli izguba olja in masti med filtriranjem. Filtriramo skozi navlažen, dvojni filtrirni papir, ki ne vsebuje maščobe. Ostanek spiramo s hladno vodo, dokler filtrat ni nevtralen. Prepričamo se, da filtrat ne vsebuje nobenih olj ali masti. Njihova prisotnost pomeni, da moramo vzorec pred hidrolizo ekstrahirati s petroletrom po postopku A.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je ostanek, prenesemo na urno steklo in ga uro in pol sušimo v sušilniku (4.3) pri temperaturi $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Dvojni filtrirni papir s suhim ostankom prenesemo v kartušo za ekstrahiranje (4.2) in pokrijemo s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščobe. Kartušo vstavimo v ekstraktor (4.1) in nadaljujemo, kakor je navedeno v drugem in tretjem odstavku 5.1.

⁽¹⁾ Če je treba olje ali masti pozneje še dodatno preskušati zaradi kakovosti, delce plovca zamenjamo s steklenimi kroglicami.

6. Izražanje rezultatov

Maso ostanka izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih isti analitik izvede na istem vzorcu, ne sme presegati:

- 0,2 % v absolutni vrednosti, za vsebnosti surovih olj in masti pod 5 %,
- 4,0 % glede na višji rezultat, za vsebnosti med 5 do 10 %,
- 0,4 % v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 10 %.

8. Opombe

- 8.1 Pri izdelkih z visoko vsebnostjo olj in masti, ki jih je težko zdrobiti ali so neprimerni za pripravo homogenega zmanjšane preskusnega vzorca, uporabimo naslednji postopek.

Natehnamo 20 g vzorca s točnostjo 1 miligram in ga zmešamo z 10 g ali več brezvodnega natrijevega sulfata (3.2). Ekstrahiramo s petroletrom (3.1), kaor je navedeno v 5.1. Dobljeni ekstrakt s petroletrom dopolnimo do 500 ml (3.1) in premešamo. 50 ml raztopine prenesemo v majhno, suho, stehtano bučko, v kateri so delci plovca⁽¹⁾. Oddestiliramo topilo, osušimo in nadaljujemo, kakor je določeno v zadnjem odstavku 5.1.

Iz ostanka po ekstrakciji v kartuši odstranimo topilo, zdrobimo ostanek do velikosti delcev 1 mm, vrnemo v kartušo za ekstrakcijo (ne dodamo natrijevega sulfata) in nadaljujemo, kakor je določeno v drugem in tretjem odstavku 5.1.

Vsebnost olj in masti kot odstotni masni delež glede na vzorec izračunamo po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

a = masa ostanka po prvi ekstrakciji (aliquotni del ekstrakta) v gramih,

b = masa ostanka po drugi ekstrakciji v gramih.

- 8.2 Pri izdelkih z nizko vsebnostjo olj in masti se lahko preskusni vzorec poveča na 5 g.
- 8.3 Hrano za hišne živali, ki vsebuje veliko vode, je treba včasih pred hidrolizo in ekstrakcijo po postopku B zmešati z brezvodnim natrijevim sulfatom.
- 8.4 V 5.2 je za spiranje ostanka po filtraciji morda učinkoviteje uporabiti toplo vodo namesto hladne.
- 8.5 Pri nekateri krmi bo morda treba podaljšati čas sušenja na več kot uro in pol. Odvečnemu sušenju se je treba izogibati, saj lahko vodi do nizkih rezultatov. Uporabi se lahko tudi mikrovalovna pečica.
- 8.6 Če je vsebnost surovih olj/masti višja od 15 %, se pred hidrolizo pri postopku A priporoča predhodna ekstrakcija in pri postopku B ponovna ekstrakcija. Do določene mere je to odvisno od vrste krme ter vrste olj in masti v krmi.

DEL C

DOLOČANJE OLAKVINDOKSA

(2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksid)

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda je namenjena določanju vsebnosti olakvindoksa v krmi. Spodnja meja določanja je 5 mg/kg.

2. Princip

Vzorec ekstrahira z mešanico vode in metanola. Vsebnost olakvindoksa določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo UV-detektorja.

⁽¹⁾ Če je treba olje ali masti pozneje še dodatno preskušati zaradi kakovosti, delce plovca zamenjamo s steklenimi kroglicami.

3. Reagenti

3.1 Metanol.

3.2 Metanol za HPLC

3.3 Voda za HPLC

3.4 Mobilna faza za HPLC:

Mešanica vode (3.3) in metanola (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardna substanca: čisti olakvindoks 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksid, E 851.

3.5.1 Osnovna standardna raztopina olakvindoksa, 250 µg/ml

Natehemo 50 mg olakvindoksa (3.5) s točnostjo 0,1 mg, prenesemo v merilno bučko in dodamo približno 190 ml vode. Bučko postavimo za 20 minut v ultrazvočno kopel (4.1). Po ultrazvočni obdelavi raztopino segrejemo do sobne temperature, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijski folijo in jo shranimo v hladilnik. Raztopino moramo pripraviti svežo vsak mesec.

3.5.2 Vmesna standardna raztopina olakvindoksa, 25 µg/ml

Prenesemo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.5.1) v 100-mililitrsko merilno bučko, dodamo do oznake mobilno fazo (3.4) in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijski folijo in jo shranimo v hladilnik. Raztopino moramo pripraviti svežo vsak dan.

3.5.3 Raztopine za umeritev:

V več 50-mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 in 20,0 ml vmesne standardne raztopine (3.5.2). Do oznake dopolnimo z mobilno fazo (3.4) in premešamo. Bučke ovijemo z aluminijski folijo. Te raztopine ustrezajo 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 in 10,0 µg olakvindoksa na ml.

Raztopine moramo pripraviti sveže vsak dan.

4. Oprema

4.1 Ultrazvočna kopel

4.2 Mehanski stresalnik

4.3 Oprema HPLC z detektorjem ultravijolične svetlobe z nastavitvijo valovnih dolžin ali detektor s serijo diod

4.3.1 Tekočinska kromatografska kolona, 250 mm x 4 mm, C18, 10 µm polnitrv, ali enakovredna

4.4 Membranski filtri 0,45 µm

5. Postopek

Opomba: Olakvindoks je občutljiv na svetlobo. Vse postopke izvajamo v temnem ali pa uporabljamo posode iz rjavega stekla.

5.1 *Splošno*

5.1.1 Analizirati moramo slepo krmo, da preverimo, da ni prisoten niti olakvindoks niti moteče substance.

5.1.2 Izvedemo preskus izkoristka z analizo slepe krme, ki smo jo obogatili s količino olakvindoksa, podobno količini v vzorcu. Za obogatitev s koncentracijo 50 mg/kg prenesemo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.5.1) v 250-mililitrsko erlenmajerico in uparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, temeljito premešamo in pustimo stati 10 minut. Preden nadaljujemo ekstrakcijo (5.2), ponovno večkrat premešamo.

Opomba: Za to metodo mora biti slepa krma podobna vrsti krme vzorca in v njej ne smemo zaznati prisotnosti olakvindoksa.

5.2 *Ekstrakcija*

Približno 50 g vzorca natehemo s točnostjo 0,01 g. Prenesimo ga v 1 000-mililitrsko erlenmajerico, dodamo 100 ml metanola (3.1) in postavimo erlenmajerico za 5 minut v ultrazvočno kopel (4.1). Dodamo 410 ml vode in pustimo še 15 minut v ultrazvočni kopeli. Bučko odstranimo iz ultrazvočne kopeli, jo 30 minut stresamo s stresalnikom (4.2) in nato filtriramo skozi naguban filter. 10,0 ml filtrata prenesemo v 20-mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Alikvot prefiltriramo skozi membranski filter (4.4). (glej opombo v 9) Nadaljujemo določanje s pomočjo HPLC (5.3).

5.3 Določanje s HPLC

5.3.1 Parametri:

Naslednji pogoji so navedeni kot vodilo, uporabljajo se lahko tudi drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Analitska kolona (4.3.1)

Mobilna faza (3.4): mešanica vode (3.3) – metanola (3.2), 900 + 100 (V + V)

Hitrost pretoka: 1,5–2 ml/min.

Valovna dolžina detekcije: 380 nm

Volumen vbrizga: 20 µl–100 µl

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.5.3), ki vsebuje 2,5 µg/ml, dokler niso dosežene konstantne višine vrhov in retenzijskih časov.

5.3.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo vsako raztopino za umeritev (3.5.3) in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da naneseemo srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.2) in pri tem uporabimo enake volumne, kot smo jih uporabili pri raztopinah za umeritev, ter določimo srednjo vrednost višine (površine) vrha olakvindoksa.

6. Izračun rezultatov

Koncentracijo raztopine vzorca v µg/ml določimo (5.3.2) iz srednje vrednosti višine (površine) vrha olakvindoksa v raztopini vzorca iz umeritvene krivulje.

Vsebnost olakvindoksa v vzorcu w v mg/kg ima naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

c = koncentracija olakvindoksa v ekstraktu vzorca (5.2) v µg/ml

m = masa preskusnega vzorca v g (5.2).

7. Validacija rezultatov

7.1 Identiteta

Identiteto analiziranega vzorca lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2) in raztopine za umeritev (3.5.3), ki vsebuje 5,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt (5.2) obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umeritev (3.5.3). Množina dodanega olakvindoksa naj bo podobna množini olakvindoksa v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko edino višina vrha olakvindoksa ob upoštevanju dodane množine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha mora biti na polovici njegove višine znotraj ± 10 % prvotne širine vrha olakvindoksa v neobogatenem ekstraktu vzorca.

7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultat ocenimo v skladu z naslednjimi merili

- (a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeleženih na najvišji točki vrha na kromatogramu mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Pri detekciji s serijo diod je to navadno ± 2 nm.

- (b) Spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, se v delih spektra med 220 in 400 nm v območju 10–100 % relativne absorbanče, ne smejo razlikovati. To merilo je izpolnjeno, če so prisotni isti maksimumi in če odstopanje med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne presega 15 % absorbanče standardnega analita.
- (c) Spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha ekstrakta vzorca se v delih spektra med 220 in 400 nm v območju 10–100 % relativne absorbanče ne smejo razlikovati. To merilo je izpolnjeno, če so prisotni isti maksimumi in če odstopanje med dvema spektroma na nobeni opazovani točki na presega 15 % absorbanče spektra na najvišji točki vrha.

Če eno od teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analiziranega vzorca ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % relativno glede na višji rezultat za vsebnost olakvindoksa med 10 in 200 mg/kg.

7.3 Izkoristek

V obogatenem slepem vzorcu mora biti izkoristek najmanj 90 %.

8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

V EU je bila izvedena medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri so v do 13 laboratorijih analizirali štiri različne vrste krme za pajske, med katerimi je bila tudi slepa krma. Rezultati so prikazani spodaj:

Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
srednja vrednost (mg/kg)	–	14,6	48,0	95,4
(S _r) (mg/kg)	–	0,82	2,05	6,36
(S _R) (mg/kg)	–	1,62	4,28	8,42
CV _r (%)	–	5,6	4,3	6,7
CV _R (%)	–	11,1	8,9	8,8
Nominalna vsebnost (mg/kg)	–	15	50	100
izkoristek (%)	–	97,3	96,0	95,4

L : število laboratorijev

n : število posamičnih vrednosti

S_r : standardni odmik ponovljivosti

S_R : standardni odmik obnovljivosti

CV_r : koeficient variacije ponovljivosti

CV_R : koeficient variacije obnovljivosti

9. Opomba

Čeprav metoda ni bila validirana za krmo, ki vsebuje več kot 100 mg/kg olakvindoksa, je mogoče dobiti zadovoljive rezultate tako, da uporabimo manjšo maso vzorca in/ali razredčimo ekstrakt (5.2), tako da dobimo koncentracijo v območju umeritvene krivulje (5.3.2).