

31998L0064

L 257/14

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

19.9.1998

DYREKTYWA KOMISJI 98/64/WE**z dnia 3 września 1998 r.****ustanawiająca wspólnotowe metody analiz do oznaczenia aminokwasów, surowych olejów i tłuszczów oraz olaquindoksu w paszach i zmieniająca dyrektywę 71/393/EWG****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

należy ustalić wspólnotowe metody analiz w celu sprawdzenia tych substancji;

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do urzędowej kontroli pasz ⁽¹⁾, ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia Austrii, Finlandii i Szwecji, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

dyrektywa 70/373/EWG wymaga, żeby urzędowe kontrole pasz były przeprowadzone wspólnotowymi metodami pobierania próbek i analizy w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych dotyczących jakości i składu pasz;

Artykuł 1

Państwa Członkowskie zapewniają, że analizy związane z urzędową kontrolą zawartości aminokwasu, surowego oleju i tłuszczu oraz olaquindoksu w paszach są przeprowadzane metodami ustalonymi w niniejszym Załączniku.

dyrektywa Rady 79/373/EWG z dnia 2 kwietnia 1979 r. w sprawie wprowadzenia do obrotu mieszanek paszowych ⁽²⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 97/47/WE ⁽³⁾ oraz dyrektywa Rady 93/74/EWG z dnia 13 września 1993 r. w sprawie pasz przeznaczonych na szczególne potrzeby żywieniowe ⁽⁴⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą 96/25/WE ⁽⁵⁾, przewidują, że aminokwasy oraz surowe oleje i tłuszcze mają być wymienione na etykiecie pasz;

Artykuł 2

W Załączniku do dyrektywy Komisji 71/393/EWG punkt „4. Oznaczanie surowych olejów i tłuszczów” zastępuje się częścią B Załącznika do niniejszej dyrektywy.

dyrektywa Rady 70/524/EWG z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych ⁽⁶⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 98/19/WE ⁽⁷⁾, przewiduje, że zawartość olaquindoksu, w przypadku dodania tej substancji do mieszanki paszowej, musi być podana na etykiecie;

Artykuł 3

druga dyrektywa Komisji 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ustanawiająca wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz ⁽⁸⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 84/4/EWG ⁽⁹⁾, ustala metody analiz, między innymi do oznaczania surowych olejów i tłuszczów; gdzie jest to właściwe, zmienić opisaną metodę;

1. Do dnia 31 grudnia 1998 r. Państwa Członkowskie wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy. Bezzwłocznie informują o tym Komisję.

Państwa Członkowskie stosują te środki od dnia 1 stycznia 1999 r.

Środki przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia przyjmowane są przez Państwa Członkowskie.

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

⁽²⁾ Dz.U. L 86 z 6.4.1979, str. 30.

⁽³⁾ Dz.U. L 211 z 5.8.1997, str. 45.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 237 z 22.9.1993, str. 23.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 125 z 23.5.1996, str. 35.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 270 z 14.12.1970, str. 1.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 96 z 28.3.1998, str. 39.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 279 z 20.12.1971, str. 7.

⁽⁹⁾ Dz.U. L 15 z 18.1.1984, str. 28.

2. Państwa Członkowskie bezzwłocznie przekazują Komisji tekst podstawowych przepisów prawa krajowego przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą.

Artykuł 5

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 3 września 1998 r.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

W imieniu Komisji

Franz FISCHLER

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

CZĘŚĆ A

OZNACZANIE AMINOKWASÓW

1. Cel i zakres

Metoda ta ma na celu oznaczanie wolnych (syntetycznych i naturalnych) oraz ogółem (peptydów związanych i wolnych) aminokwasów w paszach za pomocą analizatora aminokwasów. Metoda ta może być stosowana w odniesieniu do następujących aminokwasów: cysteiny (cystyny), metioniny, lizyny, treoniny, alaniny, argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, histydyny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, proliny, seryny, tyrozyny i waliny.

Metoda nie pozwala odróżnić soli aminokwasów, a także postaci D i L aminokwasów. Nie można jej stosować do oznaczania tryptofanu lub wodorotlenowych pochodnych aminokwasów.

2. Zasada

2.1. Wolne aminokwasy

Wolne aminokwasy są ekstrahowane rozcieńczonym kwasem solnym. Ekstrahowane jednocześnie makrocząsteczki związków azotowych są wytrącane kwasem sulfosalicylowym i usuwane przez filtrowanie. Wartość pH przefiltrowanego roztworu jest doprowadzana do 2,20 pH. Aminokwasy są rozdzielane metodą chromatografii jonowymiennej i oznaczane w reakcji z ninhydriną metodą fotometryczną przy długości fali 570 nm.

2.2. Aminokwasy ogółem

Wybór metody zależy od badanych aminokwasów. Przed ich hydrolizą cysteina i metionina muszą być poddane utlenieniu odpowiednio do kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny. Tyrozyna musi być ustalona w hydrolizatach nieutlenionych próbek. Wszystkie pozostałe aminokwasy wymienione w ust. 1 mogą być ustalone w próbce utlenionej lub nieutlenionej.

Utlenianie odbywa się w temperaturze 0 °C przy użyciu mieszaniny kwasu nadmanganowego i fenolu. Nadmiar odczynnika utleniającego zostaje rozłożony za pomocą disiarczku sodu. Utleniona lub nieutleniona próbka jest poddawana hydrolizie przy użyciu kwasu solnego ($c = 6 \text{ mol/l}$) w ciągu 23 godzin. Hydrolizat jest doprowadzany do 2,20 pH. Aminokwasy są rozdzielane metodą chromatografii jonowymiennej i oznaczane na drodze reakcji z ninhydriną metodą fotometryczną przy długości fali 570 nm (440 nm w przypadku proliny).

3. Odczynniki

Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub odpowiadającą jej pod względem jakości (przewodność właściwa $< 10 \text{ }\mu\text{S}$).

- 3.1. Nadtlenek wodoru, w 30 %.
- 3.2. Kwas mrówkowy, w 98–100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Siarczyny sodu.
- 3.5. Wodorotlenek sodu.
- 3.6. Kwas 5-sulfosalicylowy dwuwodny.
- 3.7. Kwas solny, gęstość około 1,18 g/ml.
- 3.8. Dwuwodny cytrynian trisodowy.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).
- 3.10. Chlorek sodu.
- 3.11. Ninhydryna.
- 3.12. Eter naftowy, temperatura wrzenia 40–60 °C.
- 3.13. Norleucyna lub inny związek odpowiedni do stosowania jako wzorzec wewnętrzny.
- 3.14. Azot gazowy ($< 10 \text{ ppm}$ tlenu).

- 3.15. Oktanol-1.
- 3.16. Aminokwasy.
- 3.16.1. Substancje podstawowe wymienione w ust. 1. Używać czystych bezwodnych związków. Suszyć w próżni w obecności P_2O_5 lub H_2SO_4 przez okres jednego tygodnia przed użyciem.
- 3.16.2. Kwas cysteinowy.
- 3.16.3. Sulfon metioniny.
- 3.17. Roztwór wodorotlenku sodu, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
Rozpuścić 300 g NaOH (ppkt 3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 litra.
- 3.18. Roztwór wodorotlenku sodu, $c = 1 \text{ mol/l}$.
Rozpuścić 40 g NaOH (ppkt 3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 litra.
- 3.19. Roztwór wodny kwasu mrówkowego i fenolu.
Wymieszać 889 g kwasu mrówkowego (ppkt 3.2) z 111 g wody i dodać 4,73 g fenolu (ppkt 3.3).
- 3.20. Mieszanina hydrolizująca, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ zawierająca dodatek 1 g fenolu/l:
Dodać 1 g fenolu (ppkt 3.3) do 492 ml HCl (ppkt 3.7) i uzupełnić do 1 litra wodą.
- 3.21. Mieszanina ekstrakcyjna, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, zawierająca 2 % tiodiglikolu:
8,2 ml HCl (ppkt 3.7) rozpuścić w około 900 ml wody, dodać 20 ml tiodiglikolu (ppkt 3.9) i uzupełnić do 1 litra wodą (nie mieszać bezpośrednio odczynników ppkt 3.7 i 3.9).
- 3.22. Kwas 5-sulfosalicylowy, $\beta = 6 \%$:
Rozpuścić 60 g kwasu 5-sulfosalicylowego (ppkt 3.6) w wodzie i uzupełnić do 1 litra wodą.
- 3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmrówkowy–fenol):
Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenu wodoru (ppkt 3.1) z 4,5 ml wodnego roztworu kwasu mrówkowego i fenolu (ppkt 3.19). Inkubować w temperaturze 20–30 °C przez 1 godzinę w celu utworzenia kwasu nadmrówkowego, następnie ochłodzić w wodnej łaźni z lodem (15 minut) przed dodaniem do próbki.
- Uwaga:*
Unikać kontaktu ze skórą i nosić odzież ochronną.
- 3.24. Bufor cytrynianowy, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
Rozpuścić 19,61 g cytrynianu sodu (ppkt 3.8), 5 ml tiodiglikolu (ppkt 3.9), 1 g fenolu (ppkt 3.3) i 16,50 ml HCl (ppkt 3.7) w około 800 ml wody. Doprowadzić pH do 2,20. Uzupełnić do 1 litra wodą.
- 3.25. Bufor elucyjny, przygotowany zgodnie z warunkami dla analizatora (ppkt 4.9).
- 3.26. Odczynnik ninhydrynowy, przygotowany zgodnie z warunkami dla analizatora (ppkt 4.9).
- 3.27. Roztwory mianowane aminokwasów. Roztwory te powinny być przechowywane w temperaturze poniżej 5 °C.
- 3.27.1. Podstawowe roztwory mianowane aminokwasów (ppkt 3.16.1). $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$, każdy jako kwas solny. Mogą być otrzymane w handlu.
- 3.27.2. Podstawowe roztwory mianowane kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$.
Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego (ppkt 3.16.2) i 0,2265 g sulfometioniny (ppkt 3.16.3) w buforze cytrynianowym (ppkt 3.24) w jednolitrowej kolbie miarowej i uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 12 miesięcy. Roztworu tego nie stosuje się, jeżeli podstawowy roztwór mianowany (ppkt 3.27.1) zawiera kwas cysteinowy i sulfon metioniny.
- 3.27.3. Macierzysty roztwór mianowany wzorca wewnętrzznego, np. norleucyny, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/l}$.
Rozpuścić 0,6560 g norleucyny (ppkt 3.13) w buforze cytrynianowym (ppkt 3.24) w kolbie miarowej i uzupełnić do 250 ml buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 6 miesięcy.
- 3.27.4. Wzorcowy roztwór mianowany aminokwasów do użycia z hydrolizatami, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ innych aminokwasów.

W zlewce 100 ml rozpuścić 2,2 g chlorku sodu (ppkt 3.10) z 30 ml buforu cytrynianowego (ppkt 3.24). Dodać 4,00 ml podstawowego roztworu mianowanego aminokwasów (ppkt 3.27.1), 4,00 ml podstawowego roztworu mianowanego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny (ppkt 3.27.2) i dodać 0,50 ml podstawowego roztworu mianowanego wzorca wewnętrznego (ppkt 3.27.3). Za pomocą wodorotlenku sodu (ppkt 3.18) doprowadzić pH do wartości 2,20.

Przenieść ilościowo do 50 ml kolby miarowej, uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym (ppkt 3.24) i wymieszać.

Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 3 miesiące.

Patrz także obserwacje 9.1.

- 3.27.5. Wzorcowy roztwór mianowanych aminokwasów do stosowania z hydrolizatami przygotowanymi zgodnie z ppkt 5.3.3.1 i do użycia z ekstraktami (ppkt 5.2). Roztwór wzorcowy jest przygotowywany zgodnie z 3.27.4 z pominięciem chlorku sodu.

Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 3 miesiące.

4. Aparatura

- 4.1. 100 lub 250 ml kolba okrągłodenna z chłodnicą zwrotną.
- 4.2. 100 ml butelka ze szkła borokrzemowego z nakrętką pokrytą gumą/teflonem (np. Duran, Schott) do stosowania w piecu.
- 4.3. Piec z silnym nawiewem i regulacją temperatury z dokładnością ± 2 °C.
- 4.4. Pełhametr (dokładność do trzeciego miejsca po przecinku).
- 4.5. Filtr membranowy (0,2 μm).
- 4.6. Wirówka.
- 4.7. Obrotowa wyparka próżniowa.
- 4.8. Mieszadło magnetyczne lub mechaniczna wytrząsarka.
- 4.9. Analizator aminokwasów lub aparat HPLC z kolumną jonowymienną, z przystawką do ninhydryny, pochodnych po przejściu przez kolumnę i detektorem fotometrycznym.

Kolumna jest wypełniona sulfonowaną żywicą polistyrenową posiadającą zdolność selektywnego rozdzielania aminokwasów od siebie i od innych ninhydrynooddatnych składników. Przepływ buforu i ninhydryny przyprzewodzony jest przez pompy przepływowe o stabilności przepływu $\pm 0,5$ % podczas analizy zarówno standardów wzorcowych, jak i próbek.

W niektórych analizatorach aminokwasów mogą być stosowane metody hydrolizy hydrolizatów o stężeniu sodu 0,8 mol/l zawierających całą pozostałość kwasu mrówkowego z metody utleniania. Inne analizatory przy nadmiarze kwasu mrówkowego i/lub wysokiej zawartości sodu nie dają zadowalającego rozdzielania niektórych aminokwasów. W tym przypadku objętość kwasu jest zmniejszana przez odparowanie próbki po hydrolizie do około 5 ml przed skorygowaniem pH. Odparowywanie powinno być prowadzone pod próżnią w temperaturze nieprzekraczającej 40 °C.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie próbek

Próbkę należy zmielić tak, aby przechodziła przez sito 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgoci muszą być przed zmieleniem wysuszone albo suchym powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej 50 °C lub przez zamrożenie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed zmieleniem powinny zostać poddane ekstrakcji za pomocą eteru naftowego (ppkt 3.12).

5.2. Oznaczanie wolnych aminokwasów w paszach i premiksach

Zważyć z dokładnością do 0,2 mg odpowiednią ilość (1–5 g) przygotowanej próbki (ppkt 5.1) do kolby stożkowej i dodać 100,0 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (ppkt 3.21). Mieszać zawartość przez 60 min, używając wytrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (ppkt 4.8). Odstawić do sedymentacji osadu i pobrać pipetą 10,0 ml supernatantu do 100 ml zlewki.

Dodać mieszając 5,0 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego (ppkt 3.22), mieszać za pomocą mieszadła magnetycznego przez 5 minut. W celu usunięcia osadu przefiltrować lub odwirować supernatant. Przenieść 10,0 ml otrzymanego roztworu do 100 ml zlewki i doprowadzić pH do 2,20 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.18), przenieść ilościowo do kolby miarowej o odpowiedniej objętości, używając buforu cytrynianowego (ppkt 3.24) i uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym (ppkt 3.24).

Jeżeli stosowany ma być wzorzec wewnętrzny, dodać należy 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (ppkt 3.27.3) do każdych 100 ml końcowej objętości roztworu i uzupełnić do kreski za pomocą buforu (ppkt 3.24).

Przeprowadzić rozdział chromatograficzny zgodnie z ppkt 5.4.

Jeżeli ekstrakty nie będą oznaczane tego samego dnia, należy je przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C.

5.3. Oznaczanie zawartości aminokwasów ogółem

5.3.1. Utlenianie

Odważyć z dokładnością 0,2 mg, 0,1–1 g przygotowanej próbki (ppkt 5.1):

- do 100 ml kolby okrągłodennej (ppkt 4.1) do hydrolizy otwartej (ppkt 5.3.2.3), lub
- do 250 ml kolby okrągłodennej (ppkt 4.1), jeżeli wymagana jest niska koncentracja sodu (ppkt 5.3.3.1), lub
- do 100 ml butelki z korkiem (ppkt 4.2), do hydrolizy zamkniętej (ppkt 5.3.2.4).

Odważone porcje próbek powinny zawierać około 10 mg azotu, a ich zawartość wilgoci nie powinna przekraczać 100 mg.

Umieścić kolbę/butelkę w łaźni wodnej z lodem i oziębic do 0 °C, dodać 5 ml mieszaniny utleniającej (ppkt 3.23) i mieszać szklaną łopatką z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę/butelkę z łopatką za pomocą folii nieprzepuszczającej powietrza (parafilm), umieścić w łaźni wodnej z lodem oraz w lodówce o temperaturze 0 °C i pozostawić na 16 godzin. Po 16 godzinach wyjąć z lodówki i usunąć nadmiar odczynnika utleniającego przez dodanie 0,84 g siarczynu sodu (ppkt 3.4).

Postępować jak w ppkt 5.3.2.1.

5.3.2. Hydroliza

5.3.2.1. Hydroliza próbek utlenionych

Do utlenionej próbki przygotowanej zgodnie z ppkt 5.3.1 dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (ppkt 3.20), starając się, aby żadna pozostałość próbki nie przywarła do bocznych ścianek naczynia lub łopatki. W zależności od planowanej metody hydrolizy postępować zgodnie z ppkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydroliza próbek nieutlenionych

Odważyć z dokładnością 0,2 mg, 0,1–1 g przygotowanych próbek (ppkt 5.1) do każdej 100 ml lub 250 ml kolby z okrągłym dnem (ppkt 4.1) lub 100 ml butelki z zakręconym korkiem (ppkt 4.2). Odważona porcja powinna zawierać około 10 mg azotu. Ostrożnie dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (ppkt 3.20) i wymieszać z próbką. Postępować zgodnie z ppkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hydroliza otwarta

Dodać trzy szklane kulki do mieszaniny w kolbie (przygotowanej zgodnie z ppkt 5.3.2.1 lub 5.3.2.2) i utrzymywać temperaturą wrzenia ze zwrotem skroplin przez 23 godziny. Po zakończonej hydrolizie umyć skraplacz w 5 ml buforu cytrynianowego (ppkt 3.24). Odłączyć naczynie i oziębic w łaźni wodnej z lodem. Postępować zgodnie z ppkt 5.3.3.

5.3.2.4. Hydroliza zamknięta

Umieścić butelkę zawierającą mieszaninę przygotowaną zgodnie z ppkt 5.3.2.1 lub 5.3.2.2 w piecu (ppkt 4.3) w temperaturze 110 °C. W czasie pierwszej godziny, aby uniknąć wzrostu ciśnienia (z powodu powstawania substancji gazowych) i zapobiec wybuchowi, należy luźno założyć korek na szyjkę butelki. *Nie zamykać butelki korkiem.* Po godzinie dokręcić korek i pozostawić butelkę w piecu (ppkt 4.3) na 23 godziny. Po zakończeniu hydrolizy wyjąć butelkę z pieca, ostrożnie otworzyć korek i umieścić butelkę w łaźni wodnej z lodem. Pozostawić do ostygnięcia.

W zależności od stosowanej procedury korekcji pH (ppkt 5.3.3) przenieść ilościowo zawartość butelki do 250 ml zlewki lub 250 ml kolby z okrągłym dnem i stosować bufor cytrynianowy (ppkt 3.24).

Postępować zgodnie z ppkt 5.3.3.

5.3.3. Ustawianie pH

W zależności od tolerancji zawartości sodu przez analizator aminokwasów (ppkt 4.9) ustawiać pH zgodnie z ppkt 5.3.3.1 lub 5.3.3.2.

5.3.3.1. Dla systemów chromatograficznych (ppkt 4.9) wymagających niskiego stężenia sodu:

Jeżeli stosujemy analizator aminokwasów wymagający niskiego stężenia sodu (objętość kwasu musi być zmniejszona), wskazane jest użycie podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.27.3).

W tym przypadku dodać 2,0 ml podstawowego roztworu wzorca wewnętrznego (ppkt 3.27.3) do hydrolizatu przed odparowaniem.

Dodać dwie krople oktanolu-1 (ppkt 3.15) do hydrolizatów otrzymanych zgodnie z ppkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

Zmniejszyć objętość do 5–10 ml poprzez odparowanie w próżniowej wyparce obrotowej (ppkt 4.7) w temperaturze 40 °C. Jeżeli objętość zostanie zmniejszona poniżej 5 ml, należy wyrzucić hydrolizat i powtórzyć analizę.

Ustalić pH na 2,20 w temperaturze pokojowej, stosując roztwór wodorotlenku sodu (ppkt 3.18), i postępować zgodnie z ppkt 5.3.4.

5.3.3.2. Dla wszystkich innych analizatorów aminokwasów (ppkt 4.9)

Dodawać ostrożnie mieszając 17 ml roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.17) do hydrolizatów otrzymanych zgodnie z ppkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4, nie przekraczając temperatury 40 °C.

Doprowadzić pH do 2,20 w temperaturze pokojowej przez dodanie roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.17), a pod koniec ustawiania pH – roztworu wodorotlenku sodu (ppkt 3.18). Postępować jak w ppkt 5.3.4.

5.3.4. Roztwór próbek do analizy chromatograficznej.

Przenieść ilościowo hydrolizaty o odpowiednim pH (ppkt 5.3.3.1 lub 5.3.3.2) za pomocą buforu cytrynianowego (ppkt 3.24) do 200 ml kolby miarowej i uzupełnić do kreski za pomocą tegoż buforu (ppkt 3.24).

Jeżeli wcześniej nie dodano wzorca wewnętrznego, dodać 2,00 ml wzorca wewnętrznego (ppkt 3.27.3) i uzupełnić do kreski buforem (ppkt 3.24). Wymieszać dokładnie.

Prześć do analizy chromatograficznej (ppkt 5.4).

Jeżeli tak przygotowane roztwory próbek nie są analizowane tego samego dnia, muszą być przechowywane w temperaturze poniżej 5 °C.

5.4. Chromatografia

Przed analizą chromatograficzną przenieść ekstrakt (ppkt 5.2) lub hydrolizat (ppkt 5.3.4) do temperatury pokojowej. Dobrze wymieszać mieszaninę i przefiltrować odpowiednią ilość roztworu, używając filtru 0,2 µm. (ppkt 4.5). Tak otrzymany klarowny roztwór będzie poddany chromatografii jonowymiennej za pomocą analizatora aminokwasów (ppkt 4.9).

Nałożenia próbki można dokonać ręcznie lub automatycznie. Ważnym jest, aby nanosić na kolumnę ilościowo takie same objętości z dokładnością $\pm 0,5\%$ zarówno do analizy wzorców, jak i próbki badanej ze wzorcem wewnętrznym oraz aby stosunek sól:aminokwas był jednakowy zarówno w próbce badanej, jak i w stosowanym roztworze mianowanym.

Zasadniczo, częstość przeprowadzania kalibracji jest uzależniona od stabilności roztworu ninhydryny, jak i do całego systemu analitycznego. Wzorzec lub badana próbka jest wymywana za pomocą buforu cytrynianowego (ppkt 3.24), tak aby dać powierzchnię pod pikiem wzorca odpowiadającą 30–200 % powierzchni pod pikiem próbki aminokwasów.

Przebieg analizy chromatograficznej aminokwasów jest różny i zależy od typu stosowanego analizatora oraz użytej żywicy. Wybrany system musi mieć zdolność rozdzielu poszczególnych aminokwasów od siebie oraz od innych związków dających z ninhydryną barwną reakcję związków. W zakresie prowadzonych badań stosowany system chromatografii powinien dawać liniową odpowiedź na zmiany zawartości aminokwasów podawanych na kolumnę.

Gdy analizowane są równomolowe roztwory (oznaczanych aminokwasów), stosować omówiony niżej stosunek wysokości dolina:wysokość piku. Równomolowy roztwór musi zawierać co najmniej 30 % maksymalnej ilości każdego aminokwasu, który można prawidłowo oznaczyć z użyciem stosowanego systemu analizy (ppkt 4.9).

Dla rozdzielania treoniny od seryny stosunek wysokości dolina:pik dla niższego z pokrywających się aminokwasów nie powinien przekraczać 2:10 (jeżeli wyłącznie cystyna/cysteina, metionina, treonina i lizyna są oznaczane, niepełne rozdzielanie sprzężonych pików ma ujemny wpływ na oznaczenie). Dla wszystkich innych aminokwasów rozdział musi być lepszy niż 1:10.

System musi zapewniać rozdział lizyny od „artefaktów lizyny” i od ornityny.

6. Obliczenia wyników

Powierzchnia pików próbki i wzorca jest mierzona dla każdego pojedynczego aminokwasu, na podstawie czego wyliczana jest zawartość w g aminokwasu na kg próbki.

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

Jeżeli stosowany był wzorzec wewnętrzny, należy pomnożyć przez: $\frac{D}{C}$

- A = powierzchnia piklu, hydrolizat lub ekstrakt
- B = powierzchnia piklu, wzorcowy roztwór mianowany
- C = powierzchnia piklu, wewnętrzny wzorec w hydrolizacie lub ekstrakcie
- D = powierzchnia piklu, wzorec wewnętrzny, wzorcowy roztwór mianowany
- MW = masa cząsteczkowa oznaczanego aminokwasu
- E = stężenie wzorca w $\mu\text{mol/ml}$
- W = masa próbki (g) (sprowadzić do masy wyjściowej, jeżeli odtłuszczono lub suszono)
- F = ml hydrolizatu ogółem (ppkt 5.3.4) lub ml obliczonej ogółem objętości rozcieńczonego ekstraktu (ppkt 6.1).

Cystyna i cysteina są oznaczane wspólnie jako kwas cysteinowy w próbkach hydrolizatów utlenionych, ale przeliczenie na cystynę ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30 przez użycie MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionina jest oznaczana jako sulfon metioniny w hydrolizatach próbek utlenionych, ale przelicza się ją na metioninę, używając MW metioniny: 149,21.

Dodana wolna metionina jest ustalona po ekstrakcji jako metionina, do obliczeń stosowana jest ta sama wartość MW.

- 6.1. Sposób obliczenia ogólnej objętości rozcieńczonych ekstraktów (F) dla oznaczenia ilości wolnych aminokwasów (ppkt 5.2) jest następujący:

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

V = objętość końcowa ekstraktu

7. Ocena metody

Metoda była badana porównawczo na poziomie międzynarodowym w 1990 r. przy użyciu różnych pasz (mieszanka paszowa dla świń, komponent dla brojlerów, koncentrat białkowy i premiks). Po odrzuceniu wyników krańcowych średnie wyniki i odchylenia standardowe przedstawia poniższa tabela:

Średnia w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Komponent dla brojlerów	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów

7.1. Powtarzalność

Powtarzalność wyrażona jako „odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium” omawianego powyżej porównawczego badania przedstawia poniższa tabela:

Laboratoryjna norma odchylenia standardowe (S_1) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Komponent dla brojlerów	0,20 n = 6	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów

Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego (S_1) wewnątrz laboratorium

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Komponent dla brojlerów	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów

7.2. Odtwarzalność

Wyniki odchylenia standardowego między laboratoriami w wyżej omawianych badaniach porównawczych przedstawia tabela:

Odchylenie standardowe między laboratoriami (S_R) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Komponent dla brojlerów	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów

Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego między laboratoriami (S_R)

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Komponent dla brojlerów	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów

8. Stosowanie materiałów odwoławczych

Prawidłowe stosowanie metody powinno być sprawdzane przez wykonanie oznaczeń na certyfikowanych materiałach odwoławczych, o ile takie są dostępne. Również zalecana jest kalibracja z zastosowaniem certyfikowanych roztworów wzorcowych aminokwasów.

9. Obserwacje

- 9.1. Z powodu różnic między poszczególnymi analizatorami aminokwasów podawane tu końcowe stężenia wzorcowych roztworów mianowanych aminokwasów (patrz ppkt 3.27.4 i 3.27.5) i hydrolizatów (patrz ppkt 5.3.4) należy traktować jako wskazanie.

Zakres liniowej odpowiedzi aparatu powinien zostać sprawdzony dla wszystkich aminokwasów.

Mianowany roztwór wymywany jest buforem cytrynianowym tak, aby dać pik o powierzchni w średnim zakresie.

- 9.2. Jeżeli do analizy aminokwasów używany jest wysokociśnieniowy chromatograf cieczowy, należy zoptymalizować eksperymentalnie warunki analizy zgodnie z zaleceniami producenta.
- 9.3. Przy stosowaniu tej metody do środków żywienia zwierząt zawierających więcej niż 1 % chlorków (koncentraty, mieszanki mineralne, dodatki paszowe) oznaczenie metioniny będzie zaniżone i wtedy należy stosować szczególne postępowanie.

CZĘŚĆ B

OZNACZANIE SUROWYCH OLEJÓW I TŁUSZCZÓW

1. Cel i zakres

Metoda ta ma na celu oznaczanie surowych olejów i tłuszczów w paszach. Nie dotyczy ona analizy nasion oleistych i owoców oleistych, określonych w rozporządzeniu Rady 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r.

Zastosowanie dwóch metod opisanych poniżej zależy od rodzaju i składu paszy oraz przyczyny prowadzenia analiz.

1.1. Procedura A - Bezpośrednio ulegające wyekstrahowaniu oleje i tłuszcze

Metoda ta stosowana jest do materiałów paszowych pochodzenia roślinnego, z wyjątkiem tych, które zostały objęte zakresem stosowania procedury B.

1.2. Procedura B - Ogółem surowe oleje i tłuszcze

Metoda ta stosowana jest do materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego i wszystkich mieszanek paszowych. Jest stosowana do tych wszystkich materiałów, z których oleje i tłuszcze nie mogą być w całości wyekstrahowane bez uprzedniej hydrolizy (np. gluten, drożdże, białka ziemniaczane i produkty przetworzone np. poprzez ekstruzję, płatkowanie i ogrzewanie).

1.3. *Interpretacja wyników*

We wszystkich przypadkach, w których wynik otrzymany przy zastosowaniu procedury B jest wyższy od otrzymanego przy zastosowaniu procedury A, należy traktować wynik B jako rzeczywisty.

2. **Zasada**

2.1. *Procedura A*

Próbki są poddane ekstrakcji za pomocą eteru naftowego. Rozpuszczalnik jest oddestylowany, a pozostałość jest suszona i ważona.

2.2. *Procedura B*

Próbki są traktowane kwasem solnym i ogrzewane. Mieszanina po oziębieniu zostaje przesączona. Pozostałość jest przemylwana i suszona, następnie oznacza się ją zgodnie z procedurą A.

3. **Odczynniki**

3.1. Eter naftowy o temperaturze wrzenia 40–60 °C. Wartość bromowa powinna być poniżej 1, a pozostałość po odparowaniu poniżej 2 mg/100 ml.

3.2. Bezwodny siarczan sodu.

3.3. Kwas solny, $c = 3 \text{ mol HCl/l}$

3.4. Środek filtracyjny, np. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. **Aparatura**

4.1. Aparat do ekstrakcji. Jeżeli zawiera syfon (jak np. aparat Soxhleta), powinien być tak ustawiony, aby liczba powrotów (przelewania kropli) wynosiła 10 cykli na godzinę. Jeżeli nie ma syfonu, to objętość kropli powinna wynosić około 10 ml na minutę.

4.2. Gilzy do ekstrakcji, wolne od substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym i o porowatości odpowiadającej wymaganiom zawartym w ppkt 4.1.

4.3. Suszarka albo próżniowy zestaw do suszenia w temperaturze 75 °C $\pm$ 3 °C lub suszarka owiewowa w temperaturze 100 °C $\pm$ 3 °C.

5. **Procedura**

5.1. *Procedura A (patrz ppkt 8.1)*

Odważyć 5 g próbki z dokładnością do 1 mg, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej (ppkt 4.2) i przykryć tamponem z odtłuszczonej waty bawełnianej.

Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (ppkt 4.1) i ekstrahować przez sześć godzin za pomocą eteru naftowego (ppkt 3.1). Zebrać uzyskany ekstrakt do suchej, ważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu⁽¹⁾.

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce (ppkt 4.3) na półtorej godziny. Ostudzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut dla zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów (straty masy między dwoma następującymi po sobie ważeniami nie mogą przekraczać 1 mg).

5.2. *Procedura B*

Odważyć 2,5 g próbki z dokładnością do 1 mg (patrz ppkt 8.2), umieścić w 400 ml zlewce lub 300 ml kolbie stożkowej i dodać 100 ml kwasu solnego (ppkt 3.3) oraz kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym, a kolbę chłodnicą zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do spokojnego wrzenia w niskim płomieniu palnika lub na płytce grzejnej i utrzymywać wrzenie przez jedną godzinę. Nie dopuszczać do osadzania się produktu na ścianach naczynia.

Ostudzić i dodać środek filtracyjny (ppkt 3.4) w ilości zapobiegającej jakimkolwiek stratom oleju i tłuszczu podczas filtracji. Przefiltrować przez nawilżoną, wolną od tłuszczu podwójną bibułę filtracyjną. Przemyc pozostałość zimną wodą do czasu zobojętnienia przesączu. Sprawdzić, czy przesącz nie zawiera śladów tłuszczu lub oleju. Obecność tłuszczu lub oleju wskazuje na konieczność przeprowadzenia przed hydrolizą ekstrakcji zgodnie z procedurą A.

Umieścić na szkiełku zegarkowym podwójną bibułę filtracyjną z pozostałościami i suszyć przez półtorej godziny w suszarce owiewowej (ppkt 4.3) w 100 °C $\pm$ 3 °C.

Umieścić wysuszoną bibułę z pozostałościami w gilzie ekstrakcyjnej (ppkt 4.2) i zamknąć korkiem z odtłuszczonej waty bawełnianej. Umieścić gilzę w ekstraktorze (ppkt 4.1) i postępować zgodnie z opisem zawartym w pkt 5 akapit drugi i trzeci.

⁽¹⁾ W przypadkach, gdy tłuszcz lub olej muszą być określone jakościowo, zastąpić pumeks kuleczkami szklanymi.

6. Sposób prezentowania wyników

Wyrazić masę pozostałości jako procent masy próbki.

7. Powtarzalność

Różnice między dwoma równoległymi określeniami przeprowadzonymi dla tej samej próbki przez tego samego analityka nie powinny przekroczyć:

- 0,2 % wartości bezwzględnej dla zawartości oleju i tłuszczu poniżej 5 %,
- 4,0 % odpowiednio dla wyższych wyników o zawartości 5–10 %,
- 0,4 % wartości bezwzględnej dla zawartości powyżej 10 %.

8. Uwagi

- 8.1. Dla produktów o wysokiej zawartości olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub osiągnięcia jednorodności próbki badanej, postępować jak podano poniżej.

Odważyć 20 g próbki z dokładnością do 1 mg i wymieszać z 10 g lub więcej bezwodnego siarczanu sodu (ppkt 3.2). Ekstrahować eterem naftowym (3.1), jak podano w ppkt 5.1. Uzupełnić eterem naftowym (ppkt 3.1) otrzymany ekstrakt do objętości 500 ml i wymieszać. Pobrać 50 ml roztworu i przenieść do małej, suchej i ważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu (¹). Destylować rozpuszczalnik, suszyć i postępować jak wskazano w ppkt 5.1 akapit ostatni.

Usunąć rozpuszczalnik z pozostałości ekstrakcyjnej umieszczonej w gilzie, rozdrobnić pozostałość na cząstki 1 mm, ponownie umieścić w gilzie (nie dodawać siarczanu sodu) i postępować zgodnie z ppkt 5.1 akapit drugi i trzeci.

Przeliczyć zawartość oleju i tłuszczu jako odsetek masy próbki według podanego wzoru:

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

gdzie:

a = masa w gramach pozostałości po pierwszej ekstrakcji (część wielokrotności ekstraktu),

b = masa w gramach pozostałości po drugiej ekstrakcji.

- 8.2. Dla produktów o niskiej zawartości olejów i tłuszczów masę próbki można zwiększyć do 5 g.
- 8.3. W przypadku żywności dla zwierząt zawierającej wysoką zawartość wody może wystąpić potrzeba dodania przed hydrolizą i ekstrakcją bezwodnego siarczanu sodu, jak podaje procedura B.
- 8.4. W ppkt 5.2 do przemywania pozostałości po filtracji może być bardziej efektywne użycie wody gorącej zamiast zimnej.
- 8.5. Dla niektórych pasz może wystąpić potrzeba przedłużenia 1,5-godzinnego czasu suszenia. Należy jednak unikać nadmiernego suszenia, gdyż może prowadzić do zaniżania wyników. Można również stosować kuchenki mikrofalowe.
- 8.6. Jeżeli zawartość surowego oleju/tłuszczu jest większa niż 15 %, zaleca się stosowanie wstępnej ekstrakcji według procedury A przed hydrolizą i powtórnej ekstrakcji według procedury B.

CZĘŚĆ C**OZNACZANIE OLAQUINDOKSU**

(2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamilo]-3-metylochinoksalina-N¹,N⁴-dioksyd)

1. Cel i zakres

Metoda ta stosowana jest do ustalania zawartości olaquindoksu w paszach. Najmniejsza wykrywana ilość wynosi 5 mg/kg.

2. Zasada

Próbki są ekstrahowane przy użyciu mieszaniny woda–metanol. Zawartość olaquindoksu ustalona jest w fazie odwróconej wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu detektora UV.

(¹) W przypadkach, gdy tłuszcz lub olej muszą być określone jakościowo, zastąpić pumeks kuleczkami szklanymi.

3. Odczynniki

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, czystość HPLC.

3.3. Woda, czystość HPLC.

3.4. Faza ruchoma dla HPLC:

Woda (ppkt 3.3)–metanol (ppkt 3.2), mieszanina 900 + 100 (V + V).

3.5. Substancja podstawowa: czysty olaquinox 2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksolina-N¹,N⁴-dioksyd, E 851.

3.5.1. Podstawowy roztwór mianowany olaquindoksu, 250 µg/ml

Odważyć z dokładnością do 0,1 mg 50 mg olaquindoksu (ppkt 3.5) do 200 ml kolby miarowej i dodać około 190 ml wody. Następnie umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.1) na 20 minut. Roztwór potraktowany ultradźwiękami doprowadzić do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Świeży roztwór musi być przygotowywany każdego miesiąc.

3.5.2. Pośredni roztwór mianowany olaquindoksu, 25 µg/ml

Pobrać 10,0 ml podstawowego roztworu mianowanego (ppkt 3.5.1) i przenieść do 100 ml kolby miarowej, uzupełnić do kreski fazą ruchomą (ppkt 3.4) i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Ten świeży roztwór musi być przygotowywany codziennie.

3.5.3. Roztwory wzorcowe:

Do serii 50 ml kolb miarowych przenieść kolejno po 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml pośredniego roztworu mianowanego (ppkt 3.5.2). Uzupełnić do kreski za pomocą fazy ruchomej (ppkt 3.4) i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwory te odpowiadają zawartości 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, i 10 µg olaquindoksu/ml.

Świeże roztwory należy przygotowywać codziennie.

4. Aparatura

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.2. Wytrząsarka mechaniczna.

4.3. Aparat HPLC z detektorem promieniowania ultrafioletowego o różnej długości fali lub z detektorem diodowym.

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 mm x 4 mm, wypełnienie C18, 10 µm lub równoważne.

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm.

5. Procedura

Uwaga: Olaquinox jest wrażliwy na działanie światła. Prowadzić całą procedurę w ograniczonym oświetleniu lub używać szkła brązowego.

5.1. Uwagi ogólne

5.1.1. Wyjściowa (ślepa) pasza powinna być przeanalizowana odnośnie do zawartości olaquindoksu bądź substancji interferujących.

5.1.2. Badania rozpoznawcze powinny być prowadzone przy pomocy analizy paszy wyjściowej (ślepej), do której należy dodać olaquinox w ilości takiej, jaka występuje w próbce. Aby uzyskać zawartość olaquindoksu w ślepej próbce rzędu 50 mg/kg, przenieść 10,0 ml macierzystego roztworu mianowanego (ppkt 3.5.1) do 250 ml kolby stożkowej i odparować roztwór do objętości 0,5 ml. Dodać 50 g paszy wyjściowej, wymieszać dokładnie i pozostawić na 10 min, wielokrotnie w tym czasie mieszając. Przejść do ekstrakcji, postępując dalej zgodnie z ppkt 5.2.

Uwaga: Do celów niniejszej metody ślepa (wyjściowa) pasza powinna być podobna do próbek paszy badanej i nie powinna zawierać olaquindoksu.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć z dokładnością 0,01 g około 50 g próbki. Przenieść do 1000 ml kolby stożkowej, dodać 100 ml metanolu (ppkt 3.1) i umieścić na 5 minut w łaźni ultradźwiękowej (ppkt 4.1). Dodać 410 ml wody i pozostawić w łaźni ultradźwiękowej na następne 15 minut. Przenieść kolbę z łaźni i wytrząsać przez 30 minut, stosując wytrząsarkę mechaniczną (ppkt 4.2), następnie przesączyć przez pofałdowaną bibułę filtracyjną. Przenieść 10 ml filtratu do 20 ml kolby miarowej, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Rozcieńczony roztwór przefiltrować przez filtr membranowy (ppkt 4.4) (patrz 9. obserwacja). Prowadzić oznaczenia metodą HPLC (ppkt 5.3).

5.3. Analiza HPLC

5.3.1. Parametry:

Jako wskazówki przykładowe podane są następujące warunki. Dopuszczalne jest stosowanie innych warunków, o ile dają równoważne wyniki.

Kolumna analityczna (ppkt 4.3.1)

Faza ruchoma (ppkt 3.4): woda (ppkt 3.3)–metanol (ppkt 3.2), 900 + 100 (V + V)

Szybkość przepływu: 1,5–2 ml/min.

Detekcja, długość fali: 380 nm

Objętość podana na kolumnę: 20 µl–100 µl

Sprawdzić stabilność układu chromatograficznego, wprowadzić kilkakrotnie roztwór wzorcowy (ppkt 3.5.3) zawierający 2,5 µg/ml do uzyskania stałej wysokości pików i czasu retencji.

5.3.2. Krzywa wzorcowa

Wprowadzić każdy roztwór wzorcowy (ppkt 3.5.3) kilkakrotnie i określić średnią wysokość pików (powierzchnię) dla każdego stężenia. Wykonać wykres wzorcowy, nanosząc na oś rzędnych średnią wysokość (powierzchnię) pików, a na oś odciętych odpowiadające mu stężenie.

5.3.3. Roztwór próbki

Wstrzyknąć ekstrakt próbki (ppkt 5.2), kilka razy stosując taką samą objętość jak zastosowano przy roztworach wzorcowych i oznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików olaquindoksu.

6. Obliczanie wyników

Stężenie olaquindoksu w badanych próbkach w µg/ml ustala się ze średniej wysokości (powierzchni) pików olaquindoksu próbki badanej i odpowiadającego stężeniu na krzywej wzorcowej (ppkt 5.3.2).

Zawartość olaquindoksu wyrażoną w mg/kg próbki jest otrzymywana z obliczenia następującego wzoru:

$$W = \frac{c \cdot x}{m}$$

gdzie:

c = stężenie olaquindoksu w ekstrakcie próbki (ppkt 5.2) w µg/ml

m = masa badanej porcji w g (ppkt 5.2).

7. Zatwierdzenie wyników

7.1. Identyczność

Identyczność analizy można potwierdzić poprzez współchromatografię lub przez użycie detektora z zestawem diod, dzięki czemu przeprowadza się porównanie uzyskanych rozdziałów próbek ekstraktu (ppkt 5.2) i roztworu wzorcowego (ppkt 3.5.3) zawierającego 5,0 µg/ml.

7.1.1. Współchromatografia

Próbkę ekstraktu (ppkt 5.2) wzbogaca się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu wzorcowego (ppkt 3.5.3). Ilość dodanego olaquindoksu powinna być taka sama jak oznaczono w próbce ekstraktu.

Przy rozważaniu ilości dodanego związku i rozcieńczenia ekstraktu powinna być podniesiona tylko wysokość pików olaquindoksu. Jeżeli chodzi o szerokość pików olaquindoksu w połowie jego wysokości, musi być ona między ± 10 % oryginalnej szerokości pików olaquindoksu próbki bez dodatku roztworu wzorcowego (niewzbogaconej).

7.1.2. Detekcja za pomocą zestawu diod

Wyniki są oceniane zgodnie z następującymi kryteriami:

- Długość fali dająca maksimum absorpcji próby i wzorca, ustalona na szczytowym pikach chromatogramu, musi znajdować się wewnątrz zdolności rozdzielczej systemu detekcji. Dla tego typu detektora zazwyczaj zawiera się w zakresie ± 2 nm.

- b) Między 220 i 400 nm widma próbki i wzorca rejestrowane w najwyższym pikie chromatogramu nie mogą być różne od tej części widma w zakresie 10–100 % odpowiedniej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy stwierdza się te same maksima i nie obserwuje się w żadnym punkcie odchylenia między dwoma widmami większego od 15 % absorbancji analizowanego wzorca.
- c) Między 220 i 400 nm widma wzrostu krzywej, wierzchołka i obniżenia zbocza pików uzyskiwane z próbek ekstraktu nie mogą się różnić od innych w tych częściach widma w zakresie 10–100 % absorbancji. Kryterium to jest spełnione, kiedy są te same maksima obecne i kiedy we wszystkich obserwowanych punktach odchylenia między widmami nie przekraczają 15 % absorbancji najwyższego pików widma.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, analiza nie może być potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnice między dwoma równoległymi oznaczeniami dla tej samej próbki nie mogą być większe niż 15 % odpowiednio do wyższych wyników zawartości olaquindoksu między 10 i 200 mg/kg.

7.3. Odzyskiwanie

Dla wzbogaconej ślepej próby odzysk powinien wynosić co najmniej 90 %.

8. Wyniki badań porównawczych

Przeprowadzono wspólny projekt badawczy WE, w nie więcej niż 13 laboratoriach dokonano analizy czterech próbek pasz dla prosiąt, w tym jednej pustej. Wyniki są podane poniżej:

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
średnia (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 zawartość (mg/kg)	–	15	50	100
Odzysk (%)	–	97,3	96,0	95,4

L : liczba laboratoriów

n : liczba pojedynczych wartości

S_r : odchylenie standardowe powtarzalności

S_R : odchylenie standardowe odtwarzalności wyników

CV_r : współczynnik zmienności powtarzalności

CV_R : współczynnik zmienności powtarzalności.

9. Uwagi

Chociaż metoda ta nie może być oceniona dla pasz zawierających więcej niż 100 mg/kg olaquindoksu, jest jednak możliwe otrzymanie zadowalających wyników poprzez pobranie mniejszej wagowo próbki i/lub rozcieńczenie ekstraktu (ppkt 5.2) do osiągnięcia stężenia w zakresie krzywej wzorcowej (ppkt 5.3.2).