

Ovaj je tekst namijenjen isključivo dokumentiranju i nema pravni učinak. Institucije Unije nisu odgovorne za njegov sadržaj. Vjerodostojne inačice relevantnih akata, uključujući njihove preambule, one su koje su objavljene u Službenom listu Europske unije i dostupne u EUR-Lexu. Tim službenim tekstovima može se izravno pristupiti putem poveznica sadržanih u ovom dokumentu.

► **B**

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 152/2009
od 27. siječnja 2009.

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

(Tekst značajan za EGP)

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

Koju je izmijenila:

		Službeni list		
		br.	stranica	datum
► <u>M1</u>	Uredba Komisije (EU) br. 278/2012 od 28. ožujka 2012.	L 91	8	29.3.2012.
► <u>M2</u>	Uredba Komisije (EU) br. 51/2013 od 16. siječnja 2013.	L 20	33	23.1.2013.
► <u>M3</u>	Uredba Komisije (EU) br. 691/2013 od 19. srpnja 2013.	L 197	1	20.7.2013.
► <u>M4</u>	Uredba Komisije (EU) br. 709/2014 od 20. lipnja 2014.	L 188	1	27.6.2014.
► <u>M5</u>	Uredba Komisije (EU) 2017/645 od 5. travnja 2017.	L 92	35	6.4.2017.
► <u>M6</u>	Uredba Komisije (EU) 2017/771 od 3. svibnja 2017.	L 115	22	4.5.2017.
► <u>M7</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) 2020/1560 od 26. listopada 2020.	L 357	17	27.10.2020.
► <u>M8</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) 2022/893 od 7. lipnja 2022.	L 155	24	8.6.2022.
► <u>M9</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) 2024/771 od 29. veljače 2024.	L 771	1	15.3.2024.

▼B**UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 152/2009****od 27. siječnja 2009.****o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje****(Tekst značajan za EGP)****▼M3***Članak 1.***▼M9**

Uzorkovanje za službenu kontrolu hrane za životinje, posebno u vezi s određivanjem sastojaka, uključujući materijal koji sadržava genetski modificirane organizme (GMO) ili se od njih sastoji ili proizvodi, dodataka hrani za životinje kako su definirani u Uredbi (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾ i nepoželjnih tvari kako su definirane u Direktivi 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća ⁽²⁾ provodi se u skladu s metodama iz Priloga I., uz iznimku uzorkovanja za kontrolu mikrobiološke kontaminacije.

▼M3

Metoda uzorkovanja iz Priloga I. primjenjuje se za kontrolu hrane za životinje u vezi s određivanjem ostataka pesticida kako su utvrđeni Uredbom (EZ) br. 396/2005 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽³⁾ i kontrolu sukladnosti s Uredbom (EU) br. 619/2011.

▼B*Članak 2.*

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

Članak 3.

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

Članak 4.

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

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2003. o dodacima hrani za životinje (SL L 268, 18.10.2003., str. 29.).

⁽²⁾ Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (SL L 140, 30.5.2002., str. 10.).

⁽³⁾ SL L 70, 16.3.2005., str. 1.



Članak 5.

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

Članak 6.

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

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

Članak 7.

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

Ona se primjenjuje od 26. kolovoza 2009.

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

▼ **M9***PRILOG I.***METODE UZORKOVANJA****1. SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE**

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

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

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

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

Uzorkovati se može i hrana za životinje koju subjekti u poslovanju s hranom za životinje nude na prodaju putem sredstava komuniciranja na daljinu u skladu s člankom 11. stavkom 3. Uredbe (EZ) br. 767/2009 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾. Uzorkovanje hrane za životinje koja se nudi na prodaju putem sredstava komuniciranja na daljinu u načelu podliježe točkama ovog Priloga. Posebni aspekti uzorkovanja uzoraka hrane za životinje koja se nudi na prodaju na daljinu opisani su u točki 11.

2. DEFINICIJE POJMOVA

— Serija: identificirana količina hrane za životinje za koju je utvrđeno da posjeduje zajedničke osobine kao što su podrijetlo, sorta, vrsta pakiranja, poduzeće koje pakira proizvode, pošiljatelj ili označivanje, a u slučaju proizvodnog postupka, proizvodna jedinica iz jednog pogona koji primjenjuje jedinstvene proizvodne parametre ili više takvih jedinica pri neprekinutoj proizvodnji i skupnom skladištenju.

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

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

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 767/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 13. srpnja 2009. o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje, izmjeni Uredbe (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća i stavljanju izvan snage Direktive Vijeća 79/373/EEZ, Direktive Komisije 80/511/EEZ, direktiva Vijeća 82/471/EEZ, 83/228/EEZ, 93/74/EEZ, 93/113/EZ i 96/25/EZ te Odluke Komisije 2004/217/EZ (SL L 229, 1.9.2009., str. 1.).

▼ **M9**

- Pojedinačni uzorak: količina koja se uzima iz jedne točke uzorkovanog dijela.
- Skupni uzorak: skup pojedinačnih uzoraka uzetih iz istog uzorkovanog dijela.
- Reducirani uzorak: dio skupnog uzorka dobiven postupkom reprezentativnog smanjivanja skupnog uzorka.
- Konačni uzorak: dio skupnog uzorka (pomiješanog), reduciranog uzorka ili homogeniziranog skupnog uzorka, ovisno o vrsti kontrole (vidjeti točku 9.4.).
- Laboratorijski uzorak: uzorak namijenjen laboratoriju (zaprmljen u laboratorij) koji može biti konačni, reducirani ili skupni uzorak.
- Uzorak iz prodaje na daljinu: uzorak serije hrane za životinje koja se nudi na prodaju putem sredstava komuniciranja na daljinu.

3. **OPĆE ODREDBE**

- Uzorke uzimaju osobe koje za tu svrhu ovlašćuje nadležno tijelo.
- Za uzorak iz prodaje na daljinu nadležno tijelo sredstvom komuniciranja na daljinu od subjekta u poslovanju s hranom za životinje traži određenu količinu hrane za životinje.
- Uzorak mora biti zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata.

Oznaka pečata treba biti jasno prepoznatljiva i vidljiva.

- Identifikacija uzorka: uzorak mora biti označen neizbrisivom oznakom i identificiran na način da postoji nedvojbeni veza s izvješćem o uzorkovanju.
- Iz svakog skupnog uzorka ili reduciranog uzorka uzimaju se sljedeći konačni uzorci: jedan za kontrolu (za potrebe provedbe) i jedan za subjekt u poslovanju s hranom za životinje (za potrebe prizivnog postupka) Može se uzeti i još jedan konačni uzorak za referencu. Ako je cjelokupni skupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog skupnog uzorka, osim ako je takav postupak u suprotnosti s pravilima država članica u pogledu prava subjekta u poslovanju s hranom za životinje.
- U skladu s člankom 15. stavcima 1. i 2. Uredbe (EU) 2017/625, ako je to potrebno za obavljanje službenog uzorkovanja, subjekti u poslovanju s hranom za životinje, ako to zahtijevaju nadležna tijela:
 - osoblju nadležnih tijela omogućuju pristup opremi koja je pod njihovim nadzorom, uključujući, prema potrebi, stavljanje na raspolaganje odgovarajuće opreme za uzorkovanje i osobne zaštitne opreme,
 - pomažu i surađuju s osobljem nadležnih tijela kako bi se omogućilo uzorkovanje, uključujući pristup hrani za životinje osoblju nadležnih tijela.

▼ **M9**

4. OPREMA

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

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

4.2.1.1. Lopatica za uzorkovanje s ravnim dnom i okomitim stranicama.

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

Ako sonda za uzorkovanje ima više otvora, otvori trebaju biti odvojeni pregradama ili naizmjenično raspoređeni kako bi se osiguralo da se uzorak uzima na različitim mjestima uzduž sonde.

4.2.2. *Mehaničko uzorkovanje*

Za uzorkovanje hrane za životinje koja je u pokretu može se koristiti prikladna mehanička oprema. Mehanička oprema smatra se prikladnom ako se uzorkuje najmanje cijeli presjek protoka.

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

4.2.3. *Razdjelnik*

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

5. KOLIČINSKI ZAHTJEVI U POGLEDU BROJA POJEDINAČNIH UZORAKA

— Količinski zahtjevi iz točaka 5.1. i 5.2. u pogledu broja pojedinačnih uzoraka primjenjuju se za uzorkovane dijelove u veličinama do najviše 500 tona koji se mogu uzorkovati na reprezentativan način. Opisani postupak uzorkovanja važeći je i za količine veće od propisane maksimalne veličine uzorkovanog dijela pod uvjetom da se zanemari najveći broj pojedinačnih uzoraka iz sljedećih tablica u točkama 5.1.1., 5.1.3. i 5.1.5., pri čemu se broj pojedinačnih uzoraka određuje formulom kvadratnog korijena navedenom u odgovarajućem dijelu postupka (vidjeti točku 5.3.), a najmanja veličina skupnog uzorka razmjerno se povećava. Time se ne sprječava dijeljenje velike serije u manje podserije te uzorkovanje svake podserije u skladu s postupkom opisanim u točkama 5.1. i 5.2.

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

— Za vrlo velike serije ili podserije (> 500 tona) i za serije koje se prevoze ili skladište na takav način da se uzorkovanje ne može provesti u skladu s postupkom uzorkovanja propisanim točkama 5.1. i 5.2. ove točke, primjenjuje se postupak uzorkovanja propisan točkom 5.3.

▼ **M9**

- Za uzorke iz prodaje na daljinu nadležnom tijelu obično nije poznata veličina serije iz koje se traži količina. Stoga se ne može primjenjivati postupak iz točaka 5.1. i 5.2. U tom se slučaju primjenjuje postupak opisan u točki 11.
- U slučaju da je prema propisima obvezan postupati u skladu s ovom Uredbom u okviru obveznog sustava praćenja, subjekt u poslovanju s hranom za životinje može odstupati od količinskih zahtjeva predviđenih ovom točkom kako bi se u obzir uzele operativne karakteristike pod uvjetom da je nadležnom tijelu dokazao istovjetnost postupka uzorkovanja u pogledu reprezentativnosti i nakon dobivenog odobrenja nadležnog tijela.
- Iznimno, ako nije moguće provesti navedenu metodu uzorkovanja u pogledu količinskih zahtjeva zbog neprihvatljive komercijalne štete na seriji (zbog oblika pakiranja, prijevoznih sredstava, načina skladištenja itd.), može se primijeniti zamjenska metoda uzorkovanja pod uvjetom da je što reprezentativnija te da je u potpunosti opisana i dokumentirana.

5.1. Količinski zahtjevi u pogledu pojedinačnih uzoraka pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje

5.1.1. Kruta hrana za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tona	7
> 2,5 tona	$\sqrt{\text{ (20 puta broj tona u uzorkovanom dijelu) } (*)}$, do 40 pojedinačnih uzoraka

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

5.1.2. Tekuća hrana za životinje u rasutom stanju

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

(*) Ako nije moguće dobiti homogenu tekućinu, treba povećati broj pojedinačnih uzoraka.

5.1.3. Pakirana hrana za životinje

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

Veličina uzorkovanog dijela	Minimalni broj jedinica iz kojih treba uzeti (najmanje) jedan pojedinačni uzorak (*)
od 1 do 20 jedinica	1 jedinica (**)
od 21 do 150 jedinica	3 jedinice (**)

▼ **M9**

Veličina uzorkovanog dijela	Minimalni broj jedinica iz kojih treba uzeti (najmanje) jedan pojedinačni uzorak (*)
od 151 do 400 jedinica	5 jedinica (**)
> 400 jedinica	$\frac{1}{4} \sqrt{\text{ (broj jedinica u uzorkovanom dijelu) (***) }}$, do 40 jedinica

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

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

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

5.1.4. *Krmni blokovi i kameni za lizanje*

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

Za blokove ili kamene za lizanje čija pojedinačna težina nije veća od 1 kg pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

5.1.5. *Voluminozna krma/krmno bilje*

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka (*)
≤ 5 tona	5
> 5 tona	$\sqrt{\text{ (5 puta broj tona u uzorkovanom dijelu) (**) }}$, do 40 pojedinačnih uzoraka

(*) Uzima se u obzir da u određenim situacijama (npr. kod silaža) nije moguće uzeti potrebne pojedinačne uzorke bez uzrokovanja neprihvatljive štete na seriji. U tim se situacijama može primijeniti zamjenska metoda uzorkovanja, a smjernice za uzorkovanje takvih serija dostupne su na: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

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

5.2. **Količinski zahtjevi u pogledu pojedinačnih uzoraka pri kontroli sastojaka ili tvari ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje**

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

— kontrola aflatoksina, ražene glavice, ostalih mikotoksina i štetnih botaničkih nečistoća u krmivima,

— kontrola unakrsne kontaminacije sastojkom, uključujući genetski modificiranim materijalom, ili tvari za koju se očekuje neravnomjerna raspodjela u hrani za životinje.

Ako kontrolno tijelo utemeljeno sumnja u postojanje takve neravnomjerne raspodjele i u slučaju unakrsne kontaminacije sastojkom ili tvari u krmnoj smjesi, mogu se primijeniti količinski zahtjevi navedeni u sljedećoj tablici.

▼ M9

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

5.3. **Količinski zahtjevi u pogledu pojedinačnih uzoraka kod vrlo velikih serija**

U slučaju velikih uzorkovanih dijelova (uzorkovani dijelovi > 500 tona), broj pojedinačnih uzoraka koji se moraju uzeti = 40 pojedinačnih uzoraka + $\sqrt{\text{tona}}$ pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u cijeloj hrani za životinje ili 100 pojedinačnih uzoraka + $\sqrt{\text{tona}}$ pri kontroli sastojaka ili tvari vjerojatno neravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje.

6. **KOLIČINSKI ZAHTJEVI U POGLEDU SKUPNIH UZORAKA**

Zahtjeva se samo jedan skupni uzorak po uzorkovanom dijelu.

	Vrsta hrane za životinje	Najmanja veličina skupnog uzorka (*) (**)
6.1.	Hrana za životinje u rasutom stanju	4 kg
6.2.	Pakirana hrana za životinje:	4 kg (***)
6.3.	Tekuća ili polutekuća hrana za životinje:	4 litre
6.4.	Krmni blokovi ili kameni za lizanje:	
6.4.1.	pojedinačne mase veće od 1 kg	4 kg
6.4.2.	pojedinačne mase ne veće od 1 kg	masa četiri izvorna bloka ili kamena za lizanje
6.5.	Voluminozna krma/krmno bilje	4 kg (****)

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

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

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

(****) U slučaju voluminozne krme/krmnog bilja niske specifične gustoće (npr. sijeno, slama), veličina skupnog uzorka treba iznositi najmanje 1 kg.

▼ **M9**

7. KOLIČINSKI ZAHTEJEVI U POGLEDU KONAČNIH UZORAKA

Konačni uzorci

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

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

(*) U skladu s odredbama Uredbe (EU) br. 619/2011, konačni uzorak za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala mora sadržavati najmanje 10 000 sjemenki/zrna. To znači da veličina konačnog uzorka za kukuruz mora biti najmanje 3000 g, a za soju 2000 g. Za ostalo sjeme i zrnje kao što je ječam, proso, zob, riža, raž, pšenica i sjeme repe, veličina konačnog uzorka od 500 g odgovara količini od više od 10 000 sjemenki.

(**) Ako je veličina skupnog uzorka znatno manja od 4 kg ili litre (vidjeti u bilješkama točku 6.), može se uzeti i manja količina konačnog uzorka pod uvjetom da se to opiše i dokumentira u izvješću o uzorkovanju.

(***) Pri uzorkovanju mahunarki, zrna žitarica i orašastog voća za određivanje ostataka pesticida, najmanja veličina konačnog uzorka iznosi 1 kg u skladu s odredbama Direktive Komisije 2002/63/EZ od 11. srpnja 2002. o utvrđivanju metoda Zajednice za uzimanje uzoraka za službenu kontrolu ostataka pesticida u i na proizvodima biljnog i životinjskog podrijetla i o stavljanju izvan snage Direktive 79/700/EEZ (SL L 187, 16.7.2002., str. 30.).

(****) U slučaju provjere vizualnom inspekcijom ili mikroskopijom, količina konačnog uzorka za provjeru iznosi 1 kg.

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

8.1. **Opća načela**

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

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

Kod primjene postupaka uzorkovanja utvrđenih u ovoj točki subjekt u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik obavještava se o postupku uzorkovanja. Ako subjekt u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik dovede u pitanje taj postupak uzorkovanja, subjekt u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik omogućuje nadležnom tijelu uzorkovanje u čitavoj seriji na trošak subjekta.

8.2. **Velike serije koje se prevoze brodom**8.2.1. *Dinamičko uzorkovanje velikih serija koje se prevoze brodom*

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

Uzorkovanje se provodi po broskom skladištu (jedinica koje se može fizički odvojiti). Međutim, brodska skladišta djelomično se prazne jedno za drugim tako da nakon prijenosa u skladišne objekte više nema početnog fizičkog razdvajanja. Uzorkovanje se stoga može provesti ovisno o početnom fizičkom razdvajanju ili ovisno o razdvajanju nakon prijenosa u skladišne objekte.

▼ **M9**

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

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

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

8.2.2. *Statičko uzorkovanje serija koje se prevoze brodom*

Ako se uzorkovanje provodi statičkim uzorkovanjem, mora se primijeniti postupak istovjetan onom predviđenom za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa s gornje strane (vidjeti točku 8.4.1.).

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/ /brodskog skladišta. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimajući u obzir veličinu uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom procjenom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

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

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

8.4. **Uzorkovanje skladišnih objekata (silosa)**

8.4.1. *Uzorkovanje silosa kojima se (lako) pristupa odozgo*

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

▼ **M9**8.4.2. *Uzorkovanje silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)*

8.4.2.1. Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi) veličine > 100 tona

Hrana za životinje u takvim silosima ne može se uzorkovati na statički način. Stoga, ako se hrana za životinje u silosu mora uzorkovati i ne postoji mogućnost premještanja pošiljke, potrebno se sa subjektom dogovoriti o tome da inspektora obavijesti o trenutku istovara silosa kako bi se omogućilo uzorkovanje hrane za životinje dok je u protoku.

8.4.2.2. Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi) veličine < 100 tona

Postupak uzorkovanja sastoji se od punjenja količine od 50 do 100 kg u prijamni spremnik i uzimanje uzorka iz njega. Veličina skupnog uzorka odgovara čitavoj seriji, a broj pojedinačnih uzoraka ovisi o količini koja je iz silosa napunjena u prijamni spremnik za uzorkovanje. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom procjenom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

8.5. **Uzorkovanje hrane za životinje u rasutom stanju u velikim zatvorenim spremnicima**

Takve se serije često mogu uzorkovati samo nakon istovara. U nekim slučajevima nije moguće obaviti istovar na mjestu uvoza ili kontrole te se stoga uzorkovanje mora obaviti pri istovaru takvih spremnika.

9. UPUTE ZA UZIMANJE, PRIPREMANJE I PAKIRANJE UZORAKA

9.1. **Općenito**

Uzorci se moraju uzimati i pripremati bez nepotrebne odgode uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprječavaju promjene ili kontaminacija proizvoda. Instrumenti, površine i posude za prihvatanje uzoraka moraju biti čisti i suhi.

9.2. **Pojedinačni uzorci**

Pojedinačni uzorci moraju se uzimati nasumično i ravnomjerno raspodijeljeno iz cijelog uzorkovanog dijela i moraju biti približno jednake veličine.

Veličina pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 grama ili 25 grama za voluminoznu krmu/krmno bilje niske specifične gustoće.

Ako se u skladu s pravilima o postupku uzorkovanja utvrđenima u točki 8. mora uzeti manje od 40 pojedinačnih uzoraka, veličina pojedinačnih uzoraka određuje se ovisno o potrebnoj veličini skupnog uzorka koja se mora postići (vidjeti točku 6.).

U slučaju uzorkovanja malih serija pakirane hrane za životinje pri kojem u skladu s količinskim zahtjevima treba uzeti ograničen broj pojedinačnih uzoraka, pojedinačni uzorak čini sadržaj jedne izvorne jedinice koji ne prelazi 1 kg ili jednu litru.

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

▼ **M9**

U slučaju uzoraka iz prodaje na daljinu veličina pojedinačnog uzorka ovisi o veličini jedinice te u pojedinačnim slučajevima može sadržavati manje od 100 g ili 100 ml.

9.2.1. *Hrana za životinje u rasutom stanju*

Prema potrebi se uzorkovanje može provesti pri premještanju uzorkovanog dijela (pri utovaru ili istovaru).

9.2.2. *Pakirana hrana za životinje*

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

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

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje u skladu s točkom 5., njihov se sadržaj prema potrebi homogenizira i iz svake se jedinice uzima određena količina.

Pojedinačni se uzorci mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja.

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

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje u skladu s točkom 5., uzorci se uzimaju s različitih razina.

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

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

9.2.5. *Krmni blokovi i kameni za lizanje*

Nakon odabira potrebnog broja blokova ili kamena za lizanje namijenjenih uzorkovanju u skladu s točkom 5. može se uzeti dio svakog bloka ili kamena za lizanje. U slučaju sumnje da blok ili kamen za lizanje nije homogeniziran, kao uzorak se može uzeti cijeli blok ili kamen za lizanje.

Za blokove ili kamene za lizanje čija pojedinačna težina nije veća od 1 kg pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

9.3. **Priprema skupnih uzoraka**

Pojedinačni uzorci pomiješaju se tako da tvore skupni uzorak.

9.4. **Priprema konačnih uzoraka**

Materijal skupnog uzorka pažljivo se izmiješa ⁽¹⁾.

Svaki se uzorak stavi u prikladnu posudu/prijamni spremnik. Poduzimaju se sve mjere opreza kako bi se spriječila promjena sastava uzorka, kontaminacija ili patvorenje tijekom prijevoza ili skladištenja.

9.4.1. *Ravnomjerno raspodijeljene tvari*

U slučaju kontrole sastojaka ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje, skupni uzorak može se reprezentativno smanjiti na najmanje 2,0 kg ili 2,0 litre (reducirani uzorak) ⁽²⁾, po mogućnosti mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Za kontrolu prisutnosti ostataka pesticida u mahunarkama, zrnima žitarica i orašastom voću

⁽¹⁾ Razbiju se sve grude (prema potrebi tako što se odvoje i zatim vrate u uzorak).

⁽²⁾ Osim u slučaju voluminozne krme/krmnog bilja niske specifične gustoće.

▼ **M9**

najmanja veličina reduciranog uzorka iznosi 3 kg. Ako zbog vrste hrane za životinje nije moguće korištenje razdjelnika ili razdjelnik nije dostupan, uzorak se može smanjiti metodom četvrtanja.

Potom se iz skupnog uzorka ili reduciranih uzoraka uzmu konačni uzorci (za potrebe kontrole i prizivnog postupka i eventualno u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu s količinskim zahtjevima iz točke 7.

9.4.2. *Neravnomjerno raspodijeljene tvari*

U slučaju kontrole sastojaka, uključujući genetski modificirani materijal, ili tvari za koje je vjerojatno da su neravnomjerno raspodijeljene u hrani za životinje, skupni uzorak je:

- i. potpuno homogeniziran. Nakon toga se iz homogeniziranog skupnog uzorka uzimaju konačni uzorci (za potrebe kontrole i prizivnog postupka i eventualno u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu s količinskim zahtjevima iz točke 7.; ili
- ii. reduciran na najmanje 2 kg ili 2 litre ⁽¹⁾ mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Samo ako zbog vrste hrane za životinje nije moguće korištenje razdjelnika, uzorak se prema potrebi može smanjiti metodom četvrtanja. Za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala u okviru Uredbe (EU) br. 619/2011, reducirani uzorak mora sadržavati najmanje 35 000 sjemenki/zrna kako bi se omogućilo dobivanje konačnih uzoraka za potrebe provedbe i prizivnog postupka i eventualno u referentne svrhe od najmanje 10 000 sjemenki/zrna (vidjeti bilješku (**) u točki 6. i bilješku (*) u točki 7.).

Potom se iz reduciranog uzorka uzmu konačni uzorci približno jednake veličine u skladu s količinskim zahtjevima iz točke 7.

9.5. **Pakiranje uzoraka**

Posude ili pakiranja moraju biti zapečaćeni i označeni na način da ih nije moguće otvoriti bez oštećenja pečata. Cijela etiketa mora biti uključena u pečat. Uzorak se može pohraniti i u posudu koja se može zatvoriti tako da je nije moguće otvoriti bez nepovratnog oštećenja prijemnog spremnika ili posude, čime se sprječava ponovno korištenje prijemnog spremnika ili posude.

9.6. **Slanje uzoraka u laboratorij**

Uzorak se bez nepotrebne odgode šalje u određeni analitički laboratorij, zajedno s informacijama potrebnima analitičaru.

10. **EVIDENCIJA O UZORKOVANJU**

O svakom se uzorku mora voditi evidencija kako bi se svaki uzorkovani dio i njegova veličina mogli nedvojbeno prepoznati.

U evidenciji se također navodi svako odstupanje od postupka uzorkovanja utvrđenog ovom Uredbom.

Osim stavljanja evidencije na raspolaganje službenom kontrolnom laboratoriju, evidencija se stavlja na raspolaganje subjektu u poslovanju s hranom za životinje i/ili laboratoriju koji je odredio subjekt u poslovanju s hranom za životinje.

⁽¹⁾ Osim u slučaju voluminozne krme/krmnog bilja niske specifične gustoće.

▼M9

11. UZORAK IZ PRODAJE NA DALJINU

- U slučaju uzorka iz prodaje na daljinu hrana za životinje se od subjekta u poslovanju s hranom za životinje zahtijeva sredstvima komuniciranja na daljinu. U tom slučaju pri zahtijevanju hrane za životinje nadležno tijelo ne mora se subjektu u poslovanju s hranom za životinje predstavljati pod svojim službenim identitetom već može koristiti tajni identitet.
- Skupni uzorak i konačni uzorci uzorka iz prodaje na daljinu moraju za to ovlaštene osobe uzeti odmah nakon primitka pošiljke. Za dobivanje skupnog uzorka treba nasumice i ravnomjerno raspodijeliti iz ukupne dobivene količine uzeti odgovarajući broj pojedinačnih uzoraka te ih pažljivo pomiješati/homogenizirati u što je moguće većoj mjeri u skladu s načelima utvrđenima u točki 5. i točkama 9.2. i 9.3. Ako je hrana za životinje zapakirana u pojedinačne jedinice, treba trebaju se dobiti najmanje četiri jedinice iz kojih treba uzeti najmanje jedan pojedinačni uzorak. Ako se za pojedini slučaj utvrdi da pribavljene jedinice dolaze iz različitih serija, broj jedinica za uzorkovanje treba smanjiti i ograničiti na jedinice koje potječu iz iste serije. Ako se u uzorku iz prodaje na daljinu analiziraju sastojci ili tvari koji su neravnomjerno raspodijeljeni u hrani za životinje, broj pojedinačnih uzoraka mora biti najmanje 2,5 puta veći nego za uzorke u kojima se analiziraju tvari koje su ravnomjerno raspodijeljene u hrani za životinje.

Iz skupnog uzorka se zatim uzimaju odgovarajući konačni uzorci (za potrebe kontrole i prizivnog postupka i eventualno u referentne svrhe) u skladu s, ako je to izvedivo, načelima utvrđenima u točki 9.4., a u evidenciji o uzorkovanju navodi se da je riječ o uzorku iz prodaje na daljinu. Nadležno tijelo zatim o uzorkovanju odmah obavješćuje subjekt u poslovanju s hranom za životinje. Subjekt u poslovanju s hranom za životinje se obavješćuje i da nadležno tijelo jedan uzorak, ako je to moguće, drži na njegovu raspolaganju na određenom mjestu za potrebe prizivnog postupka ili da ga je poslalo subjektu u poslovanju s hranom za životinje ili laboratoriju koji je odredio subjekt u poslovanju s hranom za životinje u skladu s važećim nacionalnim propisima.

Ako se uzorak šalje izravno u službeni laboratorij, konačni uzorak moraju pripremiti i zapečatiti u laboratoriju osobe ovlaštene za tu svrhu ili se uzorci moraju pripremiti i zapečatiti u prisutnosti tih osoba. Evidencija o uzorkovanju uzorka iz prodaje na daljinu mora se odmah nakon dobivanja konačnih uzoraka poslati nadležnom tijelu, koje o uzorkovanju obavješćuje subjekt u poslovanju s hranom za životinje.

Smatra se da količina koju je subjekt u poslovanju s hranom za životinje isporučio nadležnom tijelu čini dio serije hrane za životinje istog razreda ili opisa. U skladu s člankom 15. Uredbe (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾, ako se utvrdi da taj dio serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, smatra se, uključujući i za uzorak iz prodaje na daljinu, da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava zahtjeve EU-a, osim ako se detaljnom procjenom (prema potrebi inspekcijom na licu mjesta) utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava zahtjeve EU-a.

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća od 28. siječnja 2002. o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane (SL L 31, 1.2.2002., str. 1.).

▼ M9*PRILOG II.***OPĆE ODREDBE O ANALITIČKIM METODAMA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE****A. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU****1. Svrha**

U postupcima navedenima u ovom Prilogu opisuje se priprema uzoraka za analizu koji se šalju kontrolnim laboratorijima nakon uzorkovanja u skladu s odredbama Priloga I.

Laboratorijski uzorci moraju se pripremiti tako da izvagane količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke, kako je predviđeno za analitičke metode.

Osim postupaka opisanih u ovom Prilogu treba slijediti smjernice za pripremu uzoraka utvrđene u normi EN ISO 6498.

2. Mjere opreza

Postupak za pripremanje uzoraka ovisi o analitičkim metodama koje se koriste te sastojcima ili tvarima koji se kontroliraju. Stoga je vrlo važno da korišteni postupak za pripremu uzoraka bude primjeren analitičkoj metodi koja se primjenjuje te sastojcima ili tvarima koji se kontroliraju.

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

Mljevenje, miješanje i prosijavanje vrši se bez odgode kako bi se uzorak što manje izlagao zraku i svjetlu. Ne smiju se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak.

Preporučuje se ručno mljevenje hrane za životinje koja je osobito osjetljiva na toplinu. Potrebno je osigurati da sama oprema ne bude izvor kontaminacije.

Pokazalo se da homogenizacija uzorka pripremom suspenzije miješanjem s visokom smicanjem s vodom u nekim slučajevima daje homogenije poduzorke od suhe homogenizacije/mljevenja, posebno ako je riječ o heterogeno raspodijeljenim kemijskim tvarima. Međutim, i homogenizacijom dostatnim suhim mljevenjem mogu se dobiti homogeni poduzorci.

U nekim slučajevima, primjerice pri određivanju ražene glavice, štetnih botaničkih nečistoća itd., uzorak se ne može homogenizirati mljevenjem, već dovoljnim miješanjem uzorka.

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

3. Postupak**3.1. Opći postupci**

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

▼M9**3.1.1. Hrana za životinje koja se može samljeti bez dodatne obrade**

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

3.1.2. Hrana za životinje koja se može samljeti nakon sušenja

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

3.1.3. Tekuća ili polutekuća hrana za životinje

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

3.1.4. Ostala hrana za životinje

- Konačni uzorci koji se ne mogu pripremiti u skladu s jednim od prethodno navedenih postupaka obrađuju se bilo kojim drugim postupkom kojim se osigurava da su količine uzoraka odvagane za analizu (testni alikvot) homogene i reprezentativne za konačne uzorke.

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

- U slučaju provjere vizualnom inspekcijom (bez korištenja mikroskopa), za provjeru se koristi čitav skupni ili konačni uzorak.
- U slučaju mikroskopske provjere, u laboratoriju se može smanjiti skupni uzorak ili dodatno smanjiti reducirani uzorak. Konačni uzorci za potrebe prizivnog postupka i eventualno u referentne svrhe uzimaju se nakon postupka istovjetnog postupku koji se slijedi za konačni uzorak u provedbene svrhe.
- Ako je čitav skupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog skupnog uzorka.
- Za određivanje ražene glavice i štetnih botaničkih nečistoća konačni uzorak se mora podijeliti u dva poduzorka jednake mase od približno 500 grama. Ispituje se jedan poduzorak. Ako je rezultat poduzoraka jednak ili manji od 50 % (analitički prag) najveće dopuštene količine, uzorak je u skladu s najvećom dopuštenom količinom. Ako je rezultat veći od 50 % najveće dopuštene količine, treba ispitati drugi poduzorak i za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom količinom upotrijebiti prosjek rezultata dvaju poduzoraka.

4. Pohrana uzoraka

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

▼ **M9****B. ODREDBE O REAGENSIMA I OPREMI KOJI SE KORISTE U ANALITIČKIM METODAMA**

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

C. PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA**1. Postupak ekstrakcije**

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

2. Postupak pročišćavanja

Nekoliko metoda utvrđuje poseban postupak pročišćavanja. U pravilu se osim postupka navedenog u metodi mogu koristiti i drugi postupci pročišćavanja pod uvjetom da se korištenim postupkom pročišćavanja za analiziranu matricu dokazano postižu rezultati analize jednakovrijedni postupku navedenom u metodi.

3. Broj određivanja

Pri analizi nepoželjnih tvari, ako je rezultat prvog određivanja znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontrolira, nisu potrebna dodatna određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguravanje kvalitete. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (drugo određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutarnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za daljnju procjenu koristi se srednja vrijednost dvaju određivanja.

Pri kontroli najmanjih i najvećih dopuštenih količina dodataka hrani za životinje, ako su rezultati prvog određivanja viši od najmanje količine ili niži od najveće dopuštene količine, nisu potrebna dodatna određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguravanje kvalitete. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (drugo određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutarnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za daljnju procjenu koristi se srednja vrijednost dvaju određivanja.

Pri kontroli označenog sadržaja tvari ili sastojka, ako rezultat prvog određivanja potvrdi označeni sadržaj, tj. ako je rezultat analize unutar prihvatljivih granica odstupanja za označeni sadržaj, nisu potrebna dodatna određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguravanje kvalitete. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (drugo određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutarnje

▼ **M9**

unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za daljnju procjenu koristi se srednja vrijednost dvaju određivanja (prosječni rezultat analize je unutar ili izvan prihvatljivih granica odstupanja za označeni sadržaj).

U nekim slučajevima te prihvatljive granice odstupanja definirane su u zakonodavstvu kao što su Uredba (EZ) br. 767/2009 i Uredba (EU) 2019/4 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾.

4. **Izvrješćivanje o korištenoj analitičkoj metodi**

Korištena analitička metoda navodi se u izvješću o analizi.

5. **Izvrješćivanje o rezultatima analize**

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

Većina vrijednosti propisanih u zakonodavstvu EU-a o hrani za životinje (npr. najveća dopuštena količina, najmanja količina) utvrđena je u odnosu na hranu za životinje s udjelom vlage od 12 %. Stoga u tim slučajevima, pri ocjeni rezultata analize izmjerenog na uzorku u odnosu na propisanu vrijednost, rezultat analize najprije treba podijeliti s udjelom suhe tvari uzorka (u %) pomnoženo s 88, kako je navedeno u sljedećoj formuli:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

pri čemu je:

Mc: udio vlage uzorka (u %). 100 – *Mc* stoga predstavlja udio suhe tvari uzorka (u %).

R_{ana}: rezultat analize izmjeren na uzorku.

R_{12 %}: rezultat za hranu za životinje s udjelom vlage od 12 %; ocjenjuje se u odnosu na propisanu vrijednost.

Osim toga, ako su ispunjeni sljedeći uvjeti:

- rezultat analize znatno (> 50 %) je niži ili viši od informacija na oznaci/specifikacije koje se kontroliraju (ovisno o tome odnose li se informacije na oznaci/specifikacija na najveću dopuštenu količinu ili na najmanju količinu);
- udio vlage uzorkovane hrane za životinje poznat je te se može utvrditi da korekcija s obzirom na udio vlage neće promijeniti procjenu,

moguće je, pod uvjetom da se koriste primjereni postupci za osiguravanje kvalitete, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, izostaviti korekciju s obzirom na udio vlage (npr. ako ne postoji specifikacija ili propisana vrijednost), osim ako je to potrebno radi tumačenja.

Ako se rezultat analize korigira s obzirom na udio vlage, u istom postupku treba korigirati i odgovarajuću mjernu nesigurnost.

⁽¹⁾ Uredba (EU) 2019/4 Europskog parlamenta i Vijeća od 11. prosinca 2018. o proizvodnji, stavljanju na tržište i uporabi lijekovite hrane za životinje, o izmjeni Uredbe (EZ) br. 183/2005 Europskog parlamenta i Vijeća i o stavljanju izvan snage Direktive Vijeća 90/167/EEZ (SL L 4, 7.1.2019., str. 1.).

▼ **M9**

U slučaju određivanja ražene glavice ili štetnih botaničkih nečistoća vizualnim/mikroskopskim pregledom nije potrebna korekcija s obzirom na udio vlage.

6. Mjerna nesigurnost analize i stupanj iskorištenja u slučaju analize nepoželjnih tvari

U pogledu nepoželjnih tvari u smislu Direktive 2002/32/EZ, smatra se da proizvod namijenjen za hranu za životinje nije u skladu s utvrđenom najvećom dopuštenom količinom ako rezultat analize kao srednja vrijednost dvaju neovisnih određivanja, u odnosu na hranu za životinje s udjelom vlage od 12 %, prelazi najveću dopuštenu količinu, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize upotrebom faktora pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %, i korekciju za iskorištenje. To znači da se za ocjenu usklađenosti koristi analizirana koncentracija nakon korekcije za iskorištenje i nakon oduzimanja proširene mjerne nesigurnosti analize. Ovaj se postupak primjenjuje samo u slučajevima kada analitička metoda omogućuje procjenu proširene mjerne nesigurnosti analize i korekcije za iskorištenje (na primjer, ne zahtijeva se u slučaju vizualnog/mikroskopskog pregleda).

Ako rezultat analize uzorka uzetog za potrebe prizivnog postupka prelazi najveću dopuštenu količinu (ne uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize), to potvrđuje nesukladnost koja je utvrđena kontrolnim uzorkom, ako u nacionalnom zakonodavstvu ne postoje posebni propisi o tome.

Rezultat analize iskazuje se na sljedeći način (ako korištena analitička metoda omogućuje procjenu proširene mjerne nesigurnosti analize:

- (a) korigirani za iskorištenje, ako je to primjereno i relevantno, a ako su korigirani, to treba navesti. Treba navesti stupanj iskorištenja, osim ako je intrinzična korekcija za mjerno odstupanje sastavni dio postupka, pri čemu je odstupanje razlika između izmjerene vrijednosti i referentne koncentracije. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja između 90 % i 110 %;
- (b) kao „x +/- U”, pri čemu je x rezultat analize, a U proširena mjerna nesigurnost analize uz upotrebu faktora pokrivanja 2 ⁽¹⁾, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %.

Međutim, ako je rezultat analize znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontrolira i pod uvjetom da se koriste primjereni postupci za osiguravanje kvalitete, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, mogu se izostaviti informacije o stupnju iskorištenja i proširenoj mjernoj nesigurnosti analize (npr. u slučaju da nema specifikacije ili propisane vrijednosti), osim ako je mjerna nesigurnost potrebna radi tumačenja.

7. Mjerna nesigurnost analize i stupanj iskorištenja u slučaju analize količine dodataka hrani za životinje

Za provjeru sukladnosti s odobrenim najmanjim i najvećim dopuštenim količinama dodataka hrani za životinje, prisutnost dodatka hrani za životinje smatra se nesukladnom s utvrđenom najmanjom i najvećom dopuštenom količinom ako se za rezultat analize, kao srednju vrijednost dvaju neovisnih određivanja, u odnosu na hranu za životinje s udjelom vlage od 12 % smatra:

- da prelazi najveću dopuštenu količinu, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize i korekciju za iskorištenje. To znači da

⁽¹⁾ Interval pouzdanosti od 95 % može se postići primjenom drugog faktora, primjerice t-faktora.

▼ **M9**

se za ocjenu usklađenosti koristi analizirana koncentracija (tj. srednja vrijednost dvaju određivanja) nakon korekcije za iskorištenje i nakon oduzimanja proširene mjerne nesigurnosti analize.

- da je manji od najmanje količine, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize i korekciju za iskorištenje. To znači da se za ocjenu usklađenosti koristi analizirana koncentracija (tj. srednja vrijednost dvaju određivanja) nakon korekcije za iskorištenje i nakon dodavanja proširene mjerne nesigurnosti analize.

Ako rezultat analize uzorka uzetog za potrebe prizivnog postupka prelazi najveću dopuštenu količinu (ne uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize), to potvrđuje nesukladnost koja je utvrđena kontrolnim uzorkom, ako u nacionalnom zakonodavstvu ne postoje posebni propisi o tome.

Rezultat analize iskazuje se na sljedeći način (ako korištena analitička metoda omogućuje procjenu proširene mjerne nesigurnosti analize:

- (a) korigirani za iskorištenje, ako je to primjereno i relevantno, a ako su korigirani, to treba navesti. Treba navesti stupanj iskorištenja, osim ako je intrinzična korekcija za mjerno odstupanje sastavni dio postupka, pri čemu je odstupanje razlika između izmjerene vrijednosti i referentne koncentracije. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja između 90 % i 110 %;
- (b) kao „x +/- U”, pri čemu je x rezultat analize (srednja vrijednost dvaju određivanja), a U proširena mjerna nesigurnost analize uz upotrebu faktora pokrivanja 2 ⁽¹⁾, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %.

⁽¹⁾ Interval pouzdanosti od 95 % može se postići primjenom drugog faktora, primjerice t-faktora.

▼ **M9***PRILOG III.***ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU SASTAVA KRMIVA I KRMNIH SMJESA****A. ODREĐIVANJE VLAGE****1. Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje udjela vlage u hrani za životinje. Kada hrana za životinje sadržava hlapljive tvari kao što su organske kiseline, treba uzeti u obzir da se pri određivanju udjela vlage utvrdi i znatna količina hlapljivih tvari.

Ova metoda ne obuhvaća analizu mliječnih proizvoda kao krmiva i krmnih smjesa uglavnom sastavljenih od mliječnih proizvoda, analizu životinjskih i biljnih masti i ulja ili analizu sjemenki uljarica i plodova uljarica.

Udio vlage u sjemenkama uljarica utvrđuje se metodom utvrđenom u normi EN ISO 665 – Određivanje količine vode i hlapljivih tvari, pri čemu se podrazumijeva da sojino zrno prije određivanja udjela vlage treba samljeti.

2. Načelo

Uzorak se osuši pod određenim uvjetima koji su različiti ovisno o vrsti hrane za životinje. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem. Kod krute hrane za životinje s visokim udjelom vlage treba izvršiti prethodno sušenje.

3. Oprema

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

3.2. Analitička vaga s preciznošću do 1 mg

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

3.4. Izotermički sušionik (± 2 °C) s električnim grijanjem i primjerenim provjetravanjem koje omogućuje brzu regulaciju temperature ⁽¹⁾.

3.5. Podesivi električni vakuumski sušionik opremljen uljnom crpkom i mehanizmom za dovod vrućeg suhog zraka ili sredstva za isušivanje (npr. kalcijevog oksida).

3.6. Eksikator s debelom metalnom ili porculanskom perforiranom pločom, koji sadržava učinkovito sredstvo za isušivanje.

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

▼ **M9****4. Postupak**

Napomena: Postupci opisani u ovom odjeljku moraju se provesti odmah nakon otvaranja pakiranja s uzorcima. Analiza se mora provesti najmanje dvaput.

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

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

4.1.2. Žitarice i gruba krupica

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

4.1.3. Tekuća ili kašasta hrana za životinje i hrana za životinje sastavljena uglavnom od ulja i masti

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

4.2. Sušenje

Posuda (točka 3.3.) s poklopcem se suši u sušioniku postavljenom na 103 °C 30 min. +/- 1 min. Izvadi se iz sušionika i ostavi ohladiti na sobnu temperaturu u eksikatoru (točka 3.6.).

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

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

Hrana za životinje koja se sastoji uglavnom (> 50 %) od ulja i masti suši se u sušioniku dodatnih 30 minuta na 103 °C. Razlika između dva vaganja ne smije biti veća od 0,1 % vlage.

4.2.2. Žitarice, brašno, gruba krupica i sitna krupica

Izvaže se posuda s poklopcem s preciznošću od 0,5 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raspoređi. Posuda se bez poklopca stavi u sušionik prethodno zagrijan na 130 °C. Posuda se stavi u sušionik što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature. Sušenje traje dva sata od trenutka kada temperatura u sušioniku ponovno padne na 130 °C. Sušionik se otvori, posuda se odmah pokrije poklopcem i izvadi iz sušionika, ostavi se hladiti od 30 do 45 minuta u eksikatoru (točka 3.6.) i izvaže s preciznošću od 1 mg.

▼ **M9**

- 4.2.3. Krmna smjesa koja sadržava više od 4 % saharoze ili laktoze: krmiva kao što su rogač, hidrolizirani žitni proizvodi, sladne klice, suhi repini rezanci, riblja i šećerna otopina.

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

Tlak se poveća na 100 torra i na tom se tlaku ostavi sušiti četiri sata na vrućem suhom zraku ili koristeći sredstvo za isušivanje (približno 300 g za 20 uzoraka). U potpunosti se slučaju vakuumska crpka isključuje kad se postigne propisani tlak. Vrijeme sušenja računa se od trenutka kada temperatura u sušioniku ponovno padne na 80 – 85 °C. Oprezno se izjednači tlak u sušioniku s atmosferskim tlakom. Sušionik se otvori, posuda se odmah pokrije poklopcem i izvadi iz sušionika, ostavi se hladiti od 30 do 45 minuta u eksikatoru (točka 3.6.) i izvaže s preciznošću od 1 mg. Suši se dodatnih 30 minuta u vakuumskom sušioniku na 80 – 85 °C i ponovo važe. Razlika između dva vaganja ne smije biti veća od 0,1 % vlage.

- 4.3. *Prethodno (djelomično) sušenje*

„Mokra” hrana za životinje s masenim udjelom manjim od 85 % suhe tvari (npr. krmno bilje, ukupni miješani obroci, (ne)tekuća hrana za životinje) mora se prije finog mljevenja djelomično osušiti kako bi se analizirale njezine stabilne tvari; za nestabilne tvari djelomično sušenje nije moguće.

Djelomično sušenje može se provesti u sušioniku s prisilnim strujanjem zraka ili u mikrovalnoj pećnici ili sušenjem zamrzavanjem. Osim kod djelomičnog sušenja zamrzavanjem, cilj je osušiti hranu za životinje uz održavanje temperature uzorka ispod 60 °C kako bi se što manje utjecalo na kemijski sastav. Sušenje na temperaturama višima od 60 °C uzrokuje kemijske promjene u hrani za životinje (npr. razgradnju bjelancevina). Prije mjerenja djelomične suhe tvari osušena hrana za životinje se uravnoteži na sobnoj temperaturi približno 15 minuta kako bi se promjena vlage do koje može doći tijekom mljevenja i skladištenja smanjila na najmanju moguću mjeru. Sušenjem na temperaturama nižima od 60 °C ne uklanjanje se sva voda iz hrane za životinje, stoga (početno) djelomično sušenje ne omogućuje utvrđivanje ukupne suhe tvari hrane za životinje. Nakon sušenja poduzorak se samelje te se analizira (konačna) suha tvar djelomično suhog uzorka (preostala vlaga od 3 % do 15 %) pri određivanju ostalih kemijskih sastojaka.

Stoga se preporučuje postupak određivanja suhe tvari u dva koraka. Najprije se odredi udio djelomične suhe tvari (ako je udio suhe tvari manji od 85 %), zatim se odredi preostali udio suhe tvari na samljevenom testnom uzorku i djelomična suha tvar pomnoži s preostalom suhom tvari kako bi se odredio ukupni udio suhe tvari.

5. **Izračun rezultata**

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

▼ M95.1. *Sušenje bez prethodnog sušenja*

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

pri čemu je:

m = početna masa testnog uzorka u gramima,

m_0 = masa suhog testnog uzorka u gramima.

5.2. *Sušenje s prethodnim sušenjem ⁽¹⁾*

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

pri čemu je:

m = početna masa testnog uzorka u gramima,

m_1 = masa testnog uzorka nakon prethodnog sušenja u gramima,

m_2 = masa testnog uzorka nakon usitnjavanja ili mljevenja u gramima,

m_0 = masa suhog testnog uzorka u gramima.

5.3. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 0,2 % apsolutne vrijednosti vlage, osim za mokru hranu za kućne ljubimce i žvakalice za pse, kod kojih razlika ne smije prelaziti 0,5 % apsolutne vrijednosti vlage.

6. **Napomena**

Ako je potrebno usitnjavanje za koje se pokaže da mijenja udio vlage u proizvodu, potrebno je korigirati rezultate analize sastojaka hrane za životinje s obzirom na udio vlage u uzorku u početnom stanju.

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

1. **Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u mastima i uljima životinjskog i biljnog podrijetla.

2. **Načelo**

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

3. **Oprema**

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

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

3.3. Pješčana kupelj ili električna grijaća ploča.

⁽¹⁾ Više informacija o izračunu navedeno je u normi EN ISO 6498 – Hrana za životinje – Priprema uzoraka za ispitivanje.

▼ M9

3.4. Eksikator s učinkovitim sredstvom za isušivanje.

3.5. Analitička vaga.

4. Postupak

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

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

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

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

5. Izračun rezultata

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

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

pri čemu je:

m = masa testnog uzorka u gramima;

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

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

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

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 0,1 % apsolutne vrijednosti.

C. ODREĐIVANJE UDJELA DUŠIKA I IZRAČUN UDJELA SIROVIH BJELANČEVINA

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje udjela sirovih bjelančevina u hrani za životinje na temelju udjela dušika određenog metodom po Kjeldahlu ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Udio dušika može se odrediti u svojoj hrani za životinje, međutim, faktor konverzije 6,25 za izračun udjela sirovih bjelančevina možda se neće moći primijeniti za insekte za hranidbu životinja (niži faktor konverzije) i određenu hranu za kućne ljubimce i bjelančevine krvne plazme (viši faktor konverzije).

▼ M9**2. Načelo**

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

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

3. Reagensi

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

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

Ovisno o vodi koja se koristi, pH-vrijednost otopine borne kiseline može se razlikovati od serije do serije. pH-vrijednost otopine borne kiseline mora iznositi 4,3 – 4,7. Za dobivanje pozitivne slijepe probe često treba izvršiti prilagodbu malim volumenom alkalija.

▼ **M9**

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

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

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

4. **Oprema**

Oprema prikladna za izvođenje postupaka razgradnje, destilacije i titracije prema metodi po Kjeldahlu.

5. **Postupak**

5.1. *Razgradnja*

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

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

Kada se otopina razbistri i postane svjetlozelena, ostavi se ključati još dva sata, a zatim se ostavi ohladiti.

5.2. *Destilacija*

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

5.2.1. *Destilacija u sumpornoj kiselini*

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

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

5.2.2. *Destilacija u bornoj kiselini*

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

▼ **M9**

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

Napomena: U poluautomatskoj destilacijskoj jedinici dodavanje suviška natrijevog hidroksida i destilacija parom automatizirani su postupci.

5.3. *Titracija*

Postupa se u skladu s točkom 5.3.1. ili 5.3.2.

5.3.1. *Sumporna kiselina*

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

5.3.2. *Borna kiselina*

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

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

Taj se postupak može izvršiti automatski parnim destilatorom s automatskom titracijom.

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

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

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

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

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

5.4. *Slijepa proba*

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

▼ M9**6. Izračun rezultata**

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

6.1. Izračun za titraciju u skladu s točkom 5.3.1.

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

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

pri čemu je:

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

V_1 = volumen (ml) NaOH (točka 3.10. ili 3.11.) korišten za titraciju uzorka;

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

m = masa (g) uzorka.

6.2. Izračun za titraciju u skladu s točkom 5.3.2.**6.2.1. Titracija klorovodičnom kiselinom**

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

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

pri čemu je:

m = masa (g) testnog dijela;

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

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

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

6.2.2. Titracija sa sumpornom kiselinom

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

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

pri čemu je:

m = masa (g) testnog dijela;

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

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

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

▼ M9**7. Provjera metode****7.1. Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

- 0,4 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina manji od 20 %,
- 2,0 % više vrijednosti za udio sirovih bjelančevina u rasponu od 20 – 40 %,
- 0,8 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina veći od 40 %.

7.2. Obnovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja provedena na istom uzorku u različitim laboratorijima ne smije prelaziti:

- 1,8 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina manji od 20 %,
- 9,0 % više vrijednosti za udio sirovih bjelančevina u rasponu od 20 – 40 %,
- 3,6 % apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina veći od 40 %.

7.3. Točnost

Provede se analiza (razgradnja, destilacija i titracija) na odgovarajućoj količini acetanilida (točka 3.13.) (npr. 0,2 do 0,3 g) u prisutnosti 1 g saharoze (točka 3.14.); za 1 g acetanilida koristi se 14,80 ml sumporne kiseline (točka 3.5.). Iskorištenje mora iznositi najmanje 99 %.

8. Napomene

- 8.1. Oprema može biti ručna, poluautomatska ili automatska. Ako je u radu opreme potreban prijenos između razgradnje i destilacije, taj se prijenos mora izvršiti bez gubitka. Ako tikvica uređaja za destilaciju nije opremljena lijevkom za dokapavanje, natrijev hidroksid se dodaje neposredno prije priključivanja tikvice na kondenzator, pri čemu se tekućina ulijeva polako niz stijenke tikvice.
- 8.2. Ako se sadržaj tikvice stvrdnjava, određivanje se započinje iznova, ali s količinom sumporne kiseline (točka 3.4.) većom od one navedene u točki 5.1.
- 8.3. Kod proizvoda s niskim udjelom dušika volumen sumporne kiseline (točka 3.7.) koji se dodaje u tikvicu za prikupljanje prema potrebi se može smanjiti na 10 ili 15 ml, a tikvica se dopuni vodom do 25 ml.
- 8.4. Kod rutinske analize za određivanje sirovih bjelančevina mogu se koristiti zamjenske analitičke metode, iako je metoda po Kjeldahlu, opisana u ovom dijelu C, referentna metoda. Za svaku matricu pojedinačno treba dokazati da su rezultati dobiveni zamjenskom metodom (npr. DUMAS) jednakovrijedni rezultatima dobivenima referentnom metodom. U izvješću o analizi treba navesti analitičku metodu korištenu za određivanje sirovih bjelančevina budući da rezultati dobiveni zamjenskom metodom, čak i nakon potvrde jednakovrijednosti, mogu odstupati od rezultata dobivenih referentnom metodom.

▼ **M9****D. ODREĐIVANJE UREE****1. Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje razine uree koja se koristi kao dodatak hrani za životinje u hrani za preživaae.

2. Načelo

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

3. Reagensi

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

3.2. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijeveg ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

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

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

4. Oprema

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

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

4.3. Spektrofotometar.

5. Postupak**5.1. Analiza uzorka**

Odvagne se 2 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese se 1 g aktivnog ugljena (točka 3.4.) u odmjernu tikvicu volumena 500 ml. Doda se 400 ml vode i 5 ml otopine Carrez I (točka 3.2.), miješa približno 30 sekunda i doda 5 ml otopine Carrez II (točka 3.3.). Miješa se 30 minuta u rotacijskoj miješalici. Volumen se dopuni vodom, protrese i filtrira.

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

5.2. Kalibracijska krivulja

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

▼ M9**6. Izračun rezultata**

Količina uree u uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje u mg uree po kg uzorka.

7. Vrednovanje metode**7.1. Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva određivanja koja je na istom uzorku u istom laboratoriju proveo isti subjekt ne smije prelaziti:

— pri 420 nm

— 50 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 5 000 mg/kg,

— 25 % više vrijednosti za udio uree od 5 000 mg/kg do manje od 7 000 mg/kg,

— 20 % više vrijednosti za udio uree 7 000 mg/kg ili veći;

— pri 435 nm

— 40 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 5 000 mg/kg,

— 25 % više vrijednosti za udio uree od 5 000 mg/kg do manje od 9 000 mg/kg,

— 5 % više vrijednosti za udio uree 9 000 mg/kg ili veći.

7.2. Obnovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja provedena na istom uzorku u različitim laboratorijima i/ili od strane različitih subjekata ne smije prelaziti:

— pri 420 nm

— 3 000 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 12 000 mg/kg,

— 4 500 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio uree od 12 000 mg/kg ili više;

— pri 435 nm

— 50 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 8 000 mg/kg,

— 25 % više vrijednosti za udio uree 8 000 mg/kg ili veći.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Organizirano je međulaboratorijsko ispitivanje na razini EU-a u kojem je sudjelovalo 18 laboratorija. Analizirano je pet pozitivnih uzoraka krmnih smjesa za preživace (MAT u tablicama 1 i 2) (1 analiza) u slijepim dvostrukim uzorcima, dok je jedan slijepi uzorak krmne smjese za preživace analiziran jedanput.

Provedeni su izračuni graničnih vrijednosti za ponovljivost (r) i obnovljivost (R), kako su definirane međunarodnim smjernicama, nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti primjenom analize varijance valjanih vrijednosti.

▼ **M9**

Izračunani podaci o učinkovitosti metode (ponovljivost, obnovljivost) prikazani su u sljedećim tablicama. Kod testiranih uzoraka, uključujući slijepe uzorke, nije bilo lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.

Tablica 1.

Svojstva učinkovitosti metode za ureu izmjerenu pri $\lambda = 420$ nm u svim materijalima

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Goveda	Ovce	Ovce	Goveda
Ciljni maseni udio (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Prosječni maseni udio. (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Standardna devijacija obnovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Standardna devijacija ponovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Relativna standardna devijacija obnovljivosti RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Relativna standardna devijacija ponovljivosti RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Granica obnovljivosti, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Granica ponovljivosti, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tablica 2.

Svojstva učinkovitosti metode za ureu izmjerenu pri $\lambda = 435$ nm u svim materijalima

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Goveda	Ovce	Ovce	Goveda
Ciljni maseni udio (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Prosječni maseni udio. (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Standardna devijacija obnovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Standardna devijacija ponovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Relativna standardna devijacija obnovljivosti RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativna standardna devijacija ponovljivosti RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Granica obnovljivosti, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Granica ponovljivosti, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

▼ M9**9. Napomene**

- 9.1. Ako udio uree prelazi 3 %, uzorak se smanji na 1 g ili se početna otopina razrijedi tako da u 500 ml nema više od 50 mg uree.
- 9.2. Ako je udio uree nizak, uzorak se povećava sve dok je filtrat proziran i bezbojan.
- 9.3. Navedeni rezultati iz međulaboratorijskih ispitivanja ne pokazuju značajnu razliku u preciznosti između uree izmjerene pri 420 nm i pri 435 nm.

E. ODREĐIVANJE AMINOKISELINA (OSIM TRIPTOFANA)

Analitičke metode koje se upotrebljavaju za određivanje aminokiselina (osim triptofana) su sljedeće:

- EN ISO 13903 Hrana za životinje – Određivanje količine aminokiselina
- EN ISO 17180 Hrana za životinje – Određivanje lizina, metionina i treonina u komercijalnim proizvodima aminokiselina i predmješavina (premiksimi) ⁽¹⁾
- analitička metoda kako je opisana u točkama od 1. do 10. u nastavku,

1. Svrha i područje primjene

Ova se metoda koristi za određivanje slobodnih (sintetičkih i prirodnih) i ukupnih (vezanih na peptide i slobodnih) aminokiselina u krmivima, krmnim smjesama i premiksima koji sadržavaju manje od 10 % ⁽²⁾ svake aminokiseline, s pomoću analizatora aminokiselina. Koristi se za sljedeće aminokiseline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, aspartatna kiselina, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin.

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

2. Načelo**2.1. Slobodne aminokiseline**

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

2.2. Ukupne aminokiseline

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

⁽¹⁾ Analitička metoda utvrđena u normi EN 17180 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje aminokiselina u hrani za životinje koja sadržava više od 10 % aminokiselina.

⁽²⁾ Ta metoda nije validirana u okviru međulaboratorijskog ispitivanja za premikse koji sadržavaju više od 10 % dodataka hrani za životinje. Međutim, može se upotrebljavati i za te matrice uz odgovarajuće manje izmjene pod uvjetom da se zatim interno validira. Dodatne informacije dostupne su na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼M9

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

3. Reagensi

Obvezno se koristi redestilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost < 10 µS).

- 3.1. Vodikov peroksid, w (w/w) = 30 %.
- 3.2. Mravlja kiselina, w (w/w) = 98 %-100 %.
- 3.3. Fenol.
- 3.4. Natrijev disulfit.
- 3.5. Natrijev hidroksid.
- 3.6. 5-sulfosalicilna kiselina dihidrat.
- 3.7. Klorovodična kiselina, gustoće približno 1,18 g/ml.
- 3.8. Trinatrij citrat dihidrat.
- 3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).
- 3.10. Natrijev klorid.
- 3.11. Ninhidrin.
- 3.12. Petroleter, vrelište 40 – 60 °C.
- 3.13. Norleucin ili drugi spoj primjeren za uporabu kao interni standard.
- 3.14. Plinoviti dušik (< 10 ppm kisika).
- 3.15. 1-oktanol.
- 3.16. Aminokiseline.
 - 3.16.1. Standardne tvari aminokiselina navedenih u točki 1. (Svrha i područje primjene). Čisti spojevi bez kristalizacijske vode. Prije uporabe suše se 1 tjedan u vakuumu s P₂O₅ ili H₂SO₄.
 - 3.16.2. Cisteinska kiselina.
 - 3.16.3. Metionin-sulfon.
- 3.17. Otopina natrijevog hidroksida, c = 7,5 mol/l:

U vodi se otopi 300 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.18. Otopina natrijevog hidroksida, c = 1 mol/l:

U vodi se otopi 40 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.19. Mravlja kiselina – otopina fenola:

Pomiješa se 889 g mravlje kiseline (točka 3.2.) sa 111 g vode i doda 4,73 g fenola (točka 3.3.).

▼ **M9**

- 3.20. Smjesa za hidrolizu, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ koja sadržava 1 g fenola/l:

Doda se 1 g fenola (točka 3.3.) u 492 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.

- 3.21. Smjesa za ekstrakciju, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ koja sadržava 2 % tiodiglikola: 8,2 ml HCl (točka 3.7.) se razrijedi s približno 900 ml vode, doda se 20 ml tiodiglikola (točka 3.9.) i dopuni vodom do 1 litre (ne smiju se izravno miješati tvari iz točaka 3.7. i 3.9.).

- 3.22. 5-sulfosalicilna kiselina, $\beta = 6 \text{ \%}$:

U vodi se otopi 60 g 5-sulfosalicilne kiseline (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.

- 3.23. Oksidacijska smjesa (peroksimravlja kiselina – fenol):

Pomiješa se 0,5 ml vodikovog peroksida (točka 3.1.) s 4,5 ml otopine mravlje kiseline i fenola (točka 3.19.) u maloj čaši. Inkubira se 1 sat na $20 - 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se dobila peroksimravlja kiselina, zatim se hladi u ledenoj kupelji (15 min.) prije dodavanja u uzorak.

Upozorenje: Izbjegavati dodir s kožom i nositi zaštitnu odjeću.

- 3.24. Citratni pufer, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:

U približno 800 ml vode otopi se 19,61 g natrijevog citrata (točka 3.8.), 5 ml tiodiglikola (točka 3.9.), 1 g fenola (točka 3.3.) i 16,50 ml HCl (točka 3.7.). Vrijednost pH podesi se na 2,20. Dopuni se vodom do 1 litre.

- 3.25. Puferi za eluiranje, pripremljeni u skladu s uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9.).

- 3.26. Reagens ninhidrin, pripremljen u skladu s uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9.).

- 3.27. Standardne otopine aminokiselina. Ove se otopine drže na temperaturi nižoj od $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

Komercijalno je dostupna.

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

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

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

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

▼ M9

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

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

Pohrani se na rok ne duži od 3 mjeseca na temperaturi nižoj od 5°C .

Vidjeti također napomenu pod točkom 9.1.

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

Pohrani se na rok ne duži od 3 mjeseca na temperaturi nižoj od 5°C .

4. Oprema

- 4.1. Tikvica s okruglim dnom volumena 100 ili 250 ml s povratnim hladilom.
- 4.2. Staklena posuda od borosilikatnog stakla volumena 100 ml s navojnim čepom obloženim gumom/teflonom (npr. Duran, Schott) za uporabu u sušioniku.
- 4.3. Sušionik s prisilnim strujanjem zraka i regulatorom temperature točnosti veće od $\pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4. pH-metar (na tri decimalna mjesta).
- 4.5. Membranski filter (0,22 μm).
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Rotacijski vakuum otparivač.
- 4.8. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica.
- 4.9. Analizator aminokiselina ili oprema za HPLC opremljena kolonom za izmjenu iona, napravom za ninhidrin i derivatizaciju nakon kolone i fotometrijskim detektorom.

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

Kod nekih analizatora aminokiselina mogu se koristiti postupci hidrolize kod kojih je koncentracija natrija u hidrolizatu $c = 0,8 \text{ mol/l}$, a hidrolizat sadržava sve ostatke mravlje kiseline iz postupka oksidacije. Druge metode ne postižu zadovoljavajuće razdvajanje nekih aminokiselina ako se u hidrolizatu nalazi suvišak mravlje kiseline i/ili visoka koncentracija natrijevih iona. U tom se slučaju volumen kiseline nakon hidrolize i prije podešavanja pH smanjuje otparivanjem na približno 5 ml. Otparivanje se vrši pod vakuumom na najviše 40°C .

▼ **M9****5. Postupak****5.1. Priprema uzorka**

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

5.2. Određivanje slobodnih aminokiselina

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

Tijekom miješanja doda se 5,0 ml otopine sulfosalicilne kiseline (točka 3.22.) i nastavi 5 minuta miješati magnetskom miješalicom. Supernatant se filtrira ili centrifugira kako bi se uklonio talog. U čašu volumena 100 ml izlije se 10,0 ml dobivene otopine i vrijednost pH podesi na 2,20 otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18.), prenese s pomoću citratnog pufera (točka 3.24.) u odmjernu tikvicu odgovarajućeg volumena i dopuni otopinom pufera (točka 3.24.) do oznake.

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

Nastavlja se s kromatografijom u skladu s točkom 5.4.

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

5.3. Određivanje ukupnih aminokiselina**5.3.1. Oksidacija**

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

- tikvicu s okruglim dnom volumena 100 ml (točka 4.1.) za otvorenu hidrolizu (točka 5.3.2.3.) ili,
- tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml (točka 4.1.) ako se zahtijeva niska koncentracija natrija (točka 5.3.3.1.) ili,
- bocu s navojnim čepom volumena 100 ml (točka 4.2.) za zatvorenu hidrolizu (točka 5.3.2.4.).

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

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

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.2.1.

▼ **M9**

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. Hidroliza oksidiranih uzoraka

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

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

5.3.2.2. Hidroliza neoksidiranih uzoraka

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

5.3.2.3. Otvorena hidroliza

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

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.3.

5.3.2.4. Zatvorena hidroliza

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

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

Nastavlja se u skladu s točkom 5.3.3.

5.3.3. Podešavanje pH

Uzimajući u obzir odstupanje analizatora aminokiselina (točka 4.9.) za natrij, podešavanje pH se provodi u skladu s točkom 5.3.3.1. ili 5.3.3.2.

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

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

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

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

▼ M9

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

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

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

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

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

5.3.4. Otopina uzorka za kromatografiju

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

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

Nastavlja se s kromatografijom (točka 5.4.).

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

5.4. Kromatografija

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

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

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

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

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

▼ M9

Kod postupka razdvajanja treonina od serina omjer minimuma i maksimuma visine pika za aminokiselinu s nižom vrijednosti između dvije aminokiseline koje se preklapaju na kromatogramu ne smije prelaziti 2: 10 (ako se određuju samo cist(e)in, metionin, treonin i lizin, nedovoljno razdvajanje od susjednih pikova negativno će utjecati na postupak određivanja). Za sve druge aminokiseline razdvajanje mora biti veće od 1: 10.

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

6. Izračun rezultata

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

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

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

A = površina pika hidrolizata ili ekstrakta

B = površina pika standardne kalibracijske otopine

C = površina pika hidrolizata ili ekstrakta kao internog standarda

D = površina pika standardne kalibracijske otopine kao internog standarda

M = molarna masa aminokiseline koja se određuje

c = koncentracija standarda u $\mu\text{mol/ml}$

m = masa uzorka (g) (ispravljena na početnu masu ako je uzorak isušen ili odmašćen)

V = ml ukupnog hidrolizata (točka 5.3.4.) ili izračunani ukupni volumen otopine ekstrakta (točka 6.1.) u ml

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

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

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

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

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

V = volumen konačnog ekstrakta

7. Vrednovanje metode

Metoda je provjerena u međulaboratorijskom ispitivanju na međunarodnoj razini provedenom 1990. na četiri različite vrste hrane za životinje (krmna smjesa za svinje, krmna smjesa za piliće u tovu, proteinski koncentrat, premiks).

▼ **M9**

Napomena: Metoda je provjerena u drugoj međunarodnoj međulaboratorijskoj studiji 2003. na slijepim dvostrukim parovima uzoraka krmne smjese za završni tov pilića, početne krmne smjese za piliće u tovu, ribljeg brašna i brašna od peradi. Za više pojedinosti vidjeti EN ISO 13903.

Rezultati srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti, dobiveni u međulaboratorijskom ispitivanju iz 1990. prikazani su u tablicama u ovoj točki:

Srednje vrijednosti u g/kg

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

n = broj uključenih laboratorija

7.1. *Ponovljivost*

Ponovljivost međulaboratorijske usporedbe iz prethodne tablice, iskazana kao „unutarlaboratorijska standardna devijacija”, prikazana je u sljedećim tablicama:

Koeficijent varijacije (%) za ponovljivost (CV_r)

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana smjesa za svinje	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Krmna smjesa za piliće u tovu	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinski koncentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = broj uključenih laboratorija

7.2. *Obnovljivost*

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

▼ **M9****Koeficijent varijacije (%) za obnovljivost (CV_r)**

Referentni materijal	Aminokiselina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana smjesa za svinje	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Krmna smjesa za piliće u tovu	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinski koncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = broj uključenih laboratorija

8. Upotreba referentnih materijala

Pravilna primjena metode provjerava se ponovljenim mjerenjima na certificiranim referentnim materijalima, kada su dostupni. Preporučuje se izvršiti kalibraciju s certificiranom otopinom za kalibraciju aminokiselina.

9. Napomene

- 9.1. Zbog razlika između analizatora aminokiselina konačne koncentracije kalibracijskih otopina standardnih aminokiselina (vidjeti točke 3.27.4. i 3.27.5.) i hidrolizata (vidjeti točku 5.3.4.) služe kao smjernica.

Za sve aminokiseline treba provjeriti područje linearnog odziva uređaja.

Standardna otopina se razrijedi citratnim puferom tako da se površine pika nalazi u sredini područja.

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

- 9.3. Primjena metode na krmne smjese ili premikse koji sadržavaju više od 1 % klorida (koncentrat, mineralne mješavine, dopunske krmne smjese) može doći do preniske procjene udjela metionina, što zahtijeva posebnu obradu.

10. Kriteriji učinkovitosti

Prikupljanjem rezultata (osim za tirozin) iz dvije međulaboratorijske studije (iz 1990., navedeni u točki 7., i iz 2005., navedeni u normi EN/ISO 13903) dobiveni su sljedeći kriteriji za ponovljivost i obnovljivost. Moguće je da se vrijednosti dobivene u ta dva međulaboratorijska ispitivanja neće moći primijeniti na raspone koncentracija i matrice drukčije od navedenih.

10.1. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja koja je na istom uzorku u istom laboratoriju proveo isti subjekt ne smije prelaziti:

- 6 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju glicina, alanina, lizina, prolina, glutaminske kiseline, izoleucina i histidina,
- 8 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju treonina, fenilalanina, metionina, aspartatne kiseline i leucina,

▼ M9

- 10 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju arginina i valina,
- 12 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu serin,
- 15 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu cist(e)in

10.2. Obnovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja provedena na istom uzorku u različitim laboratorijima i/ili od strane različitih subjekata ne smije prelaziti:

- 15 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju glicina, alanina i treonina,
- 20 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju lizina, prolina, fenilalanina, metionina i aspartatne kiseline,
- 22 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju glutaminske kiseline i leucina,
- 27 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu arginin,
- 32 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu izoleucin,
- 35 % više vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju valina i serina,
- 40 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu histidin,
- 50 % više vrijednosti za ukupnu aminokiselinu cist(e)in.

F. ODREĐIVANJE TRIPTOFANA

Analitičke metode koje se upotrebljavaju za određivanje triptofana su sljedeće:

- EN ISO 13904 Hrana za životinje – Određivanje količine triptofana,
- analitička metoda kako je opisana u točkama od 1. do 9. u nastavku,

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje ukupnog i slobodnog triptofana u hrani za životinje. Njom se ne razlikuju oblici D i L.

2. Načelo

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

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

Triptofan i interni standard u hidrolizatu ili ekstraktu određuju se HPLC-om s fluorescencijskom detekcijom.

3. Reagensi

- 3.1. Obvezno se koristi redestilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost < 10 µS/cm).

▼ **M9**

- 3.2. Interni standard: triptofan (čistoća/udio ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosfornog pentoksida.
- 3.3. Interni standard: α -metil-triptofan (čistoća/udio ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosfornog pentoksida.
- 3.4. Barijev hidroksid oktahidrat (treba paziti da se $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ pretjerano ne izlaže zraku kako bi se izbjeglo nastajanje BaCO_3 , koji može remetiti postupak određivanja) (vidjeti napomenu pod točkom 9.3.).

3.5. Natrijev hidroksid.

3.6. Ortofosforna kiselina, w (w/w) = 85 %.

3.7. Klorovodična kiselina, ρ_{20} 1,19 g/ml.

3.8. Metanol, za HPLC.

3.9. Petroleter, vrelište 40 – 60 °C.

3.10. Otopina natrijevog hidroksida, c = 1 mol/l:

U vodi se otopi 40,0 g NaOH (točka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litre (točka 3.1.).

3.11. Klorovodična kiselina, c = 6 mol/l:

Uzme se 492 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.

3.12. Klorovodična kiselina, c = 1 mol/l:

Uzme se 82 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.

3.13. Klorovodična kiselina, c = 0,1 mol/l:

Uzme se 8,2 ml HCl (točka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litre.

3.14. Ortofosforna kiselina, c = 0,5 mol/l:

Uzme se 34 ml ortofosforne kiseline (točka 3.6.) i dopuni vodom (točka 3.1.) do 1 litre.

3.15. Koncentrirana otopina triptofana (točka 3.2.), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

U odmjernoj tikvici volumena 500 ml otopi se 0,2553 g triptofana (točka 3.2.) u klorovodičnoj kiselini (točka 3.13.) i dopuni klorovodičnom kiselinom (točka 3.13.) do oznake. Pohrani se na rok ne duži od 4 tjedna na -18 °C.

3.16. Koncentrirana otopina internog standarda, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

U odmjernoj tikvici volumena 500 ml otopi se 0,2728 g α -metil-triptofana (točka 3.3.) u klorovodičnoj kiselini (točka 3.13.) i dopuni klorovodičnom kiselinom (točka 3.13.) do oznake. Pohrani se na rok ne duži od 4 tjedna na -18 °C.

3.17. Standardna kalibracijska otopina triptofana i internog standarda:

Pripremi se 2,00 ml koncentrirane otopine triptofana (točka 3.15.) i 2,00 ml koncentrirane otopine internog standarda (α -metil-triptofan) (točka 3.16.). Razrijedi se vodom (točka 3.1.) i metanolom (točka 3.8.) na približno jednak volumen i približno jednaku koncentraciju metanola (10 – 30 %) kao kod konačnog hidrolizata.

Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

Tijekom pripreme treba je zaštititi od izravnog sunčevog svjetla.

▼ M9

- 3.18. Octena kiselina.
- 3.19. 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanol.
- 3.20. Etanolamin, w (w/w) > 98 %.
- 3.21. Otopina 1 g 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.) u 100 ml metanola (točka 3.8.).
- 3.22. Mobilna faza za HPLC: 3,00 g octene kiseline (točka 3.18.) + 900 ml vode (točka 3.1.) + 50,0 ml otopine (točka 3.21.) 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.) u metanolu (točka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanolaminom (točka 3.20.) se pH-vrijednost otopine podesi na 5,00. Dopuni se vodom (točka 3.1.) do 1 000 ml.

4. Oprema

- 4.1. Oprema za HPLC sa spektrofotometrijskim detektorom.
- 4.2. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 125 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica 3 µm, ili ekvivalentna.
- 4.3. pH-metar.
- 4.4. Polipropilenska tikvica, volumena 125 ml, sa širokim vratom i navojnim čepom.
- 4.5. Membranski filter, 0,45 µm.
- 4.6. Autoklav, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.
- 4.7. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica.
- 4.8. Vrtložna miješalica.

5. Postupak**5.1. Priprema uzoraka**

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

5.2. Određivanje slobodnog triptofana (ekstrakt)

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

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

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

▼ **M9**5.3. *Određivanje ukupnog triptofana (hidrolizat)*

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

Prije otvaranja autoklava, temperatura se snizi na malo ispod 100 °C. Kako bi se spriječila kristalizacija $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, u toplu se smjesu doda 30 ml vode sobne temperature. Lagano se protrese ili promiješa. Doda se 2,00 ml koncentrirane otopine internog standarda (α -metil-triptofana) (točka 3.16.). Posude se 15 minuta hlade u vodenoj/ledenoj kupelji.

Zatim se doda 5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.14.). Posuda se drži u hladnoj kupelji i uz miješanje neutralizira s HCl (točka 3.11.), a pH-vrijednost se podesi na 3,0 s HCl (točka 3.12.). Doda se dovoljno metanola kako bi u konačnom volumenu koncentracija metanola izno-sila 10 – 30 %. Prenese se u odmjernu tikvicu odgovarajućeg volumena i razrijedi vodom do volumena potrebnog za kromatografiju (na primjer 100 ml). Dodavanje metanola ne smije izazvati taloženje.

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

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

5.4. *HPLC određivanje*

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

Kolona za tekućinsku kroma- 125 mm x 4 mm, C_{18} , veličina čestica
tografiju (točka 4.2.): 3 μm , ili ekvivalentna

Temperatura kolone: sobna temperatura

Mobilna faza (točka 3.22.): 3,00 g octene kiseline
(točka 3.18.) + 900 ml vode
(točka 3.1.) + 50,0 ml otopine
(točka 3.21.) 1,1,1-triklor-2-metil-2-
propanola (točka 3.19.) u metanolu
(točka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanola-
minom (točka 3.20.) se pH-vrijednost
otopine podesi na 5,00. Dopuni se
vodom (točka 3.1.) do 1 000 ml.

Brzina protoka: 1 ml/min

Ukupno trajanje: oko 34 min.

Valna duljina detekcije: ekscitacija: 280 nm, emisija: 356 nm

Injektirani volumen: 20 μl

▼ M9

6. Izračun rezultata

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

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

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

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

V₁ = volumen u ml (2 ml) koncentrirane otopine triptofana (točka 3.15.) dodane kalibracijskoj otopini (točka 3.17.)

c = koncentracija u μmol/ml (= 2,50) koncentrirane otopine triptofana (točka 3.15.) dodane kalibracijskoj otopini (točka 3.17.)

V₂ = volumen u ml koncentrirane otopine internog standarda (točka 3.16.) dodane pri ekstrakciji (točka 5.2.) (= 5,00 ml) ili hidrolizatu (točka 5.3.) (= 2,00 ml)

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

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

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

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

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

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 10 % najvišeg rezultat.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija na razini EU-a (četvrta međulaboratorijska usporedba), u kojoj su u najviše 12 laboratorija analizirana tri uzorka za potvrđivanje metode za hidrolizu. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Uzorak 1 Hrana za svinje	Uzorak 2 Hrana za svinje s dodanim L- triptofanom	Uzorak 3 Koncentrat za svinje
L	12	12	12
n	50	55	50
Srednja vrijednost [g/ kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09

▼ M9

	Uzorak 1 Hrana za svinje	Uzorak 2 Hrana za svinje s dodanim L- triptofanom	Uzorak 3 Koncentrat za svinje
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate
 n = broj korištenih pojedinačnih rezultata nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti (identificiranih Cochran-Dixonovim testom za ekstremne vrijednosti)
 s_r = standardna devijacija ponovljivosti
 S_R = standardna devijacija obnovljivosti
 r = ponovljivost
 R = obnovljivost
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EU-a (treća međulaboratorijska usporedba), u kojoj su u najviše 13 laboratorija analizirana dva uzorka za potvrđivanje metode za ekstrakciju slobodnog triptofana. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Uzorak 4 Smjesa pšenice i soje	Uzorak 5 Smjesa pšenice i soje (= uzorak 4) s dodanim triptofanom(0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Srednja vrijednost [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
S _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate
 n = broj korištenih pojedinačnih rezultata nakon uklanjanja ekstremnih vrijednosti (identificiranih Cochran-Dixonovim testom za ekstremne vrijednosti)
 s_r = standardna devijacija ponovljivosti
 S_R = standardna devijacija obnovljivosti
 r = ponovljivost
 R = obnovljivost
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EU-a u kojoj su u najviše sedam laboratorija analizirana četiri uzorka za potvrđivanje triptofana za hidrolizu. Rezultati su prikazani dolje. Svaki se uzorak analizirao pet puta.

▼ **M9**

	Uzorak 1 Miješana smjesa za svinje (CRM 117)	Uzorak 2 Riblje brašno s niskim udjelom masti (CRM 118)	Uzorak 3 Sojino brašno (CRM 119)	Uzorak 4 Obrano mlijeko u prahu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Srednja vrijed- nost [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate

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

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

r = ponovljivost

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

9. **Napomene**

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

Izokratsko eluiranje, nakon kojeg slijedi gradijentno pročišćivanje kolone:

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

Temperatura kolone: 32 °C

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

B: Metanol

Gradijentni program: 0 min. 100 % A 0 % B

15 min. 100 % A 0 % B

17 min. 60 % A 40 % B

19 min. 60 % A 40 % B

21 min. 100 % A 0 % B

33 min. 100 % A 0 % B

Brzina protoka: 1,2 ml/min

Ukupno trajanje: oko 33 min.

- 9.2. Postupak kromatografije se razlikuje ovisno o vrsti HPLC-a i korištenom materijalu za punjenje kolone. Odabrani sustav mora osiguravati razdvajanje bazne linije triptofana i internog standarda. Osim toga, važno je dobro odijeliti produkte razgradnje od triptofana i internog standarda. Propuštaju se hidrolizati bez internog standarda za provjeru

▼ **M9**

bazne linije internog standarda na nečistoće. Važno je da vrijeme protoka bude dovoljno dugo za eluiranje svih produkata razgradnje, inače bi zakašnjeli pikovi protoka mogli remetiti kasnije postupke kromatografiranja.

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

9.3. *Barijev hidroksid*

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

G. ODREĐIVANJE SIROVIH ULJA I MASTI

1. **Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje udjela sirovih ulja i masti u hrani za životinje.

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

Za određivanje sirovih ulja i masti u sjemenkama uljarica i plodovima uljarica te u hrani za životinje s udjelom sirovih ulja ili masti većim od 15 % ekstrakciju bi trebalo provesti postupkom A, a ponovnu ekstrakciju postupkom B (točka 5.3.).

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

Ova se metoda koristi za krmiva biljnog podrijetla, osim onih koja su obuhvaćena područjem primjene postupka B.

1.2. Postupak B – Ukupna sirova ulja i masti

Ova se metoda koristi za krmiva životinjskog podrijetla i za sve krmne smjese. Koristi se za sva krmiva iz kojih se bez prethodne hidrolize ne mogu potpuno ekstrahirati ulja i masti (npr. gluten, kvasac, krumpirovi proteini i proizvodi koji se podvrgavaju postupcima kao što je ekstrudiranje, pahuljičanje i zagrijavanje).

1.3. *Tumačenje rezultata*

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

2. **Načelo**2.1. *Postupak A*

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

2.2. *Postupak B*

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

▼ M9**3. Reagensi**

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

4. Oprema

- 4.1. Uređaj za ekstrakciju. Ako je opremljen sifonom (uređaj Soxhlet), brzina refluksa mora biti takva da proizvodi približno 10 ciklusa na sat; ako nije opremljen sifonom, brzina povratnog toka mora iznositi približno 10 ml u minuti.
- 4.2. Tuljci za ekstrakciju, slobodni od tvari topljivih u petroleteru i poroznosti u skladu sa zahtjevima iz točke 4.1.
- 4.3. Sušionik, ili vakuumski, postavljen na $75 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$, ili zračni, postavljen na $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

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

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg, prenese u tuljac za ekstrakciju (točka 4.2.) i pokrije vatom koja je slobodna od masti.

Tuljac se postavi u ekstraktor (točka 4.1.) i šest sati ekstrahira petroleterom (točka 3.1.). Ekstrakt petroletera se prikupi u suhu, izvaganu tikvicu koja sadržava krhotine plovuće⁽¹⁾.

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

5.2. Postupak B

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

Ohladi se i doda onoliko sredstva za filtriranje (točka 3.4.) koliko je potrebno da tijekom filtriranja ne dođe do gubitka ulja i masti. Filtrira se kroz navlažen dvostruki filtarski papir koji je slobodan od masti. Ostatak se ispiri hladnom vodom sve dok filtrat ne postane neutralan. Treba provjeriti da filtrat ne sadržava nikakva ulja ili masti. Njihova prisutnost znači da se uzorak prije hidrolize mora ekstrahirati petroleterom prema postupku A.

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

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

▼M9

Dvostruki filtarski papir sa suhim ostatkom se prenese u tuljac za ekstrakciju (točka 4.2.) i pokrije vatom koja je slobodna od masti. Tuljac se postavi u ekstraktor (točka 4.1.) i postupak nastavi kako je navedeno u točki 5.1. drugom i trećem odlomku.

5.3. *Postupak A i ponovna ekstrakcija postupkom B*

Za određivanje sirovih ulja i masti u sjemenkama uljarica i plodovima uljarica te u hrani za životinje s udjelom sirovih ulja ili masti većim od 15 % ekstrakciju bi trebalo provesti postupkom A, a ponovnu ekstrakciju postupkom B.

To znači da se nakon ekstrakcije petroleterom (postupak A) ostatak ili dio ostatka ponovno ekstrahira klorovodičnom kiselinom (postupak B). Udio sirovih ulja i masti je zbroj rezultata postupka A i B.

6. **Izražavanje rezultata**

Masa ostatka iskazuje se kao postotni udio uzorka.

7. **Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja koja na istom uzorku provodi isti analitičar ne smije prelaziti:

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

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

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

8. **Napomene**

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

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

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

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

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

pri čemu je:

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

m_2 = masa ostatka nakon druge ekstrakcije u gramima.

▼ M9

- 8.2. Kod nekih proizvoda (npr. onih s niskim udjelom ulja i masti) testni uzorak se može povećati.
- 8.3. Hranu za kućne ljubimce s visokim udjelom vode ponekad prije hidrolize i ekstrakcije trebati pomiješati s bezvodnim natrijevim sulfatom, u skladu s postupkom B.
- 8.4. U točki 5.2., za ispiranje ostatka nakon filtracije učinkovitije može biti korištenje vruće vode umjesto hladne vode.
- 8.5. Za određenu hranu za životinje možda će trebati produljiti vrijeme sušenja na više od 1,5 h. Treba izbjegavati prekomjerno sušenje jer može dovesti do niskih rezultata. Može se koristiti i mikrovalna pećnica.

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

Ova metoda omogućuje određivanje bezmasnih organskih tvari u hrani za životinje koje su netopljive u kiselim i baznim medijima i uobičajeno se nazivaju sirova vlaknina.

Ova se metoda ne koristi u slučaju lignoceluloze i biljnog ugljena (presitne čestice).

2. Načelo

Uzorak se prema potrebi odmast i uzastopno obradi proključalim otopinama sumporne kiseline i kalijevog hidroksida u navedenim koncentracijama. Ostatak se odvaja filtracijom kroz filter od sinteriranog stakla, ispere, osuši, izvaže i spaljuje na 475 – 500 °C. Gubitak mase zbog spaljivanja odgovara udjelu sirove vlaknine u testnom uzorku.

3. Reagensi

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

4. Oprema

- 4.1. Grijaća jedinica za razgradnju sumpornom kiselinom i otopinom kalijevog hidroksida, opremljena dodatkom za filtarski lončić (točka 4.2.) i ispusnom cijevi sa slavinom za tekućinu i vakuum, po mogućnosti sa stlačenim zrakom. Svakog dana prije početka upotrebe jedinica se pet minuta zagrijava proključalom vodom.
- 4.2. Stakleni filtarski lončić s filtarskom pločom od sinteriranog stakla, veličine pora 40 – 90 μm . Prije prve upotrebe treba se nekoliko minuta grijati na 500 °C i ohladiti (točka 8.6.).
- 4.3. Valjak volumena najmanje 270 ml s povratnim hladilom, pogodan za ključanje.
- 4.4. Sušionik s termostatom
- 4.5. Mufolna peć s termostatom
- 4.6. Jedinica za ekstrakciju sastavljena od nosive ploče za filtarski lončić (točka 4.2.) i ispusne cijevi sa slavinom za tekućinu i vakuum.

▼ M9

- 4.7. Spojni prstenovi za sklapanje grijaće jedinice (točka 4.1.), lončića (točka 4.2.) i valjka (točka 4.3.) i za priključivanje jedinice za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.) i lončića.

5. **Postupak**

Odvagne se 1 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u lončić (točka 4.2.) (vidjeti napomene pod točkama 9.1., 9.2. i 9.3.) i doda 1 g sredstva za filtriranje (točka 3.3.).

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

Tekućina se zagrijava do ključanja u 5 minuta $\pm$ 2 minute i ostavi jako ključati točno 30 minuta.

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

Ispusna se slavina zatvori, u spojeni valjak i lončić nalije se 150 ml proključale otopine kalijevog hidroksida (točka 3.7.), zatim se doda nekoliko kapi sredstva protiv pjenjenja (točka 3.2). Tekućina se zagrijava do točke ključanja u 5 minuta $\pm$ 2 minute i ostavi jako ključati točno 30 minuta. Filtrira se i ponovi postupak ispiranja kako se navodi za postupak sa sumpornom kiselinom.

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

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

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

Slijepa se proba izvodi bez uzorka. Gubitak mase pri spaljivanju ne smije prijeći 4 mg.

6. **Izračun rezultata**

Udio sirove vlaknine, iskazan kao postotni udio uzorka, izračunava se sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

m = masa uzorka u gramima;

m₀ = gubitak mase nakon spaljivanja tijekom postupka određivanja, u gramima;

m₁ = gubitak mase nakon spaljivanja tijekom slijepe probe, u gramima.

▼ M9**7. Ponovljivost**

Razlika između dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

- 0,6 % apsolutne vrijednosti za udio sirove vlaknine manji od 10 %,
- 6 % višeg rezultata za udio sirove vlaknine jednak ili veći od 10 %.

8. Obnovljivost

Razlika između rezultata dva određivanja provedena na istom uzorku u različitim laboratorijima ne smije prelaziti:

- 1,0 % apsolutne vrijednosti za udio sirove vlaknine manji od 10 %,
- 10 % višeg rezultata za udio sirove vlaknine jednak ili veći od 10 %.

9. Napomene

- 9.1. Hranu za životinje koja sadržava više od 10 % sirovih masti prije analize treba odmastiti petroleterom (točka 3.5.). Filtarski se lončić (točka 4.2.) sa svojim sadržajem spoji na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.), a ostatak se pod vakuumom tripot ispere količinom od 30 ml petroletera, pri čemu treba osigurati da je ostatak suh. Nakon što se lončić sa svojim sadržajem priključi na grijaću jedinicu (točka 4.1.) nastavlja se u skladu s točkom 5.
- 9.2. Hranu za životinje koja sadržava masti koje se ne mogu direktno ekstrahirati petroleterom (točka 3.5.) treba odmastiti u skladu s točkom 8.1. i ponovo odmastiti nakon ključanja s kiselinom. Nakon ključanja s kiselinom i naknadnog ispiranja lončić se sa svojim sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6.) i tripot ispere količinom od 30 ml acetona i tripot količinom od 30 ml petroletera. Filtrira se pod vakuumom do suhog i nastavi analiza u skladu s točkom 5, pri čemu se postupak započne dodavanjem kalijevog hidroksida.
- 9.3. Ako hrana za životinje sadržava više od 5 % karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, lončić (točka 4.2.) s izvaganim uzorkom se priključi na grijaću jedinicu (točka 4.1.). Uzorak se tripot ispere količinom od 30 ml klorovodične kiseline (točka 3.6.). Nakon svakog dodavanja uzorak se ostavi približno jednu minutu prije filtriranja. Ispere se jednom s 30 ml vode i nastavi u skladu s točkom 5.
- 9.4. Ako se koristi uređaj u obliku stalka (nekoliko lončića priključenih na istu grijaću jedinicu), u istoj se seriji ne smiju izvesti dva pojedinačna određivanja na istom uzorku za analizu.
- 9.5. Ako se kisele i bazične otopine nakon ključanja teško filtriraju, propuše se stlačeni zrak kroz ispusnu cijev grijaće jedinice i nastavi s filtriranjem.
- 9.6. Temperatura spaljivanja ne smije prijeći 500 °C kako bi se produljio vijek trajanja staklenih filtarskih lončića. Pritom treba paziti da se izbjegne pretjerani toplinski šok između ciklusa grijanja i hlađenja.

▼ **M9****I. ODREĐIVANJE ŠEĆERA****1. Svrha i područje primjene**

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

Ovu metodu treba primjenjivati za određivanje udjela šećera za izračun energetske vrijednosti hrane za životinje.

Ako se udio šećera određuje za druge svrhe, mogu se koristiti druge analitičke metode.

2. Načelo

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

3. Reagensi

3.1. Otopina etanola 40 % (v/v), gustoća: 0,948 g/ml na 20 °C, neutralizirana prema fenolftaleinu.

3.2. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijevog ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Metiloranž, 0,1 % otopina (w/v).

3.5. Klorovodična kiselina, 4 mol/l.

3.6. Klorovodična kiselina, 0,1 mol/l.

3.7. Otopina natrijevog hidroksida, 0,1 mol/l.

3.8. Luff-Schoorlov reagens:

Uz oprezno miješanje, u otopinu natrijevog karbonata (točka 3.8.2.) ulije se otopina limunske kiseline (točka 3.8.3.). Doda se otopina bakrovog sulfata (točka 3.8.1.) i dopuni vodom do 1 litre. Ostavi se preko noći i filtrira.

Provjeri se koncentracija tako dobivenog reagensa (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), vidjeti točku 5.4. zadnji odlomak. pH-vrijednost otopine mora iznositi približno 9,4.

3.8.1. Otopina bakrovog sulfata: u 100 ml vode otopi se 25 g bakrovog sulfata $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ koji ne sadržava željezo.

3.8.2. Otopina limunske kiseline: u 50 ml vode otopi se 50 g limunske kiseline, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$.

3.8.3. Otopina natrijevog karbonata: u približno 300 ml tople vode otopi se 143,8 g bezvodnog natrijevog karbonata. Ostavi se ohladiti.

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

3.10. Otopina škroba: u litru proključale vode doda se smjesa 5 g topljivog škroba u 30 ml vode. Ostavi se ključati tri minute, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

▼ M9

- 3.11. Sumporna kiselina, 3 mol/l.
- 3.12. Kalijev jodid, 30 % otopina (w/v).
- 3.13. Plovućac u zrnu prokuhan u klorovodičnoj kiselini, ispran vodom i osušen.
- 3.14. 3-metilbutan-1-ol.

4. Oprema

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

5. Postupak**5.1. Ekstrakcija uzorka**

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

5.2. Određivanje reducirajućih šećera

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

5.3. Određivanje ukupnih šećera nakon inverzije

Pipetom se prenese 50 ml otopine u odmjernu tikvicu volumena 100 ml. Doda se nekoliko kapi otopine metiloranža (točka 3.4.), zatim se oprezno, uz stalno miješanje, dodaje klorovodična kiselina (točka 3.5.) sve dok tekućina na postane potpuno crvena. Doda se 15 ml klorovodične kiseline (točka 3.6.), tikvica se potopi u vodu kupelj koja jako ključa i u njoj ostavi 30 minuta. Brzo se ohladi na približno 20 °C i doda 15 ml otopine natrijevog hidroksida (točka 3.7.). Dopuni se vodom do 100 ml i homogenizira. Prenese se najviše 25 ml otopine koja sadržava manje od 60 mg reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza. Prema potrebi se dopuni destiliranom vodom do 25 ml i Luff-Schoorlovom metodom odredi udio reducirajućih šećera. Rezultat se iskazuje kao postotak glukoze ili, prema potrebi, saharoze što se dobije množenjem s faktorom 0,95.

5.4. Titracija prema Luff-Schoorlovoj metodi

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

▼ M9

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

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

6. Izračun rezultata

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

7. Posebni postupci

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

Homogenizira se i filtrira. Etanol se ukloni u skladu s točkom 5.1. Ako nije dostupan dekstrinirani škrob, volumen se dopuni destiliranom vodom.

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

8. Napomene

- 8.1. Za sprječavanje pjenjenja preporučuje se prije ključanja s Luff-Schoorlovim reagensom dodati (bez obzira na volumen) približno 1 ml 3-metilbutan-1-ola (točka 3.14.).
- 8.2. Razlika između udjela ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza, i udjela reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza, pomnoženo s 0,95, daje postotni udio saharoze.
- 8.3. Za određivanje udjela reducirajućih šećera, osim laktoze, mogu se koristiti dvije metode:
- 8.3.1. Za približan izračun, udio laktoze, određen drugom analitičkom metodom, pomnoži se s 0,675, a dobiveni rezultat oduzme od udjela reducirajućih šećera.
- 8.3.2. Za točan izračun reducirajućih šećera, osim laktoze, mora se koristiti isti uzorak za dva konačna određivanja. Jedna se analiza izvodi na dijelu otopine dobivene postupkom iz točke 5.1., druga na dijelu otopine dobivene pri određivanju laktoze metodom utvrđenom za tu svrhu (nakon fermentiranja drugih vrsta šećera i bistenja).

▼ **M9**

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

Primjer:

Dva korištena volumena odgovaraju, za svako određivanje, uzorku od 250 mg.

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

Razlika je 16,6 mg glukoze.

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

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

Tablica vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa

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

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, inver- tirani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. ODREĐIVANJE LAKTOZE

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje razine laktoze u hrani za životinje koja sadržava više od 0,5 % laktoze.

2. Načelo

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

▼ M9**3. Reagensi**

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

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

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

3.4. Luff-Schoorlov reagens:

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

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

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

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

3.5. Plovuće u zrnju prokuhan u klorovodičnoj kiselini, ispran vodom i osušen.

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

3.7. Sumporna kiselina, 3 mol/l.

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

3.9. Otopina škroba: u litru proključale vode doda se smjesa 5 g topljivog škroba u 30 ml vode. Ostavi se ključati tri minute, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

4. Oprema

Vodena kupelj s termostatom postavljenim na 38 – 40 °C.

5. Postupak

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

Doda se 2,5 ml otopine Carrez I (točka 3.2.) i miješa 30 sekunda, zatim 2,5 ml otopine Carrez II (točka 3.3.) i ponovo miješa 30 sekunda. Dopuni se vodom do 100 ml, promiješa i filtrira. Dio filtrata ne veći od 25 ml, koji poželjno sadržava 40 do 80 mg laktoze, pipetom se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 300 ml. Prema potrebi se dopuni vodom do 25 ml.

▼ **M9**

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

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

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

6. **Izračun rezultata**

Iz priložene tablice se odredi količina laktoze u mg koja odgovara razlici između rezultata dvije titracije, iskazanih u ml natrijevog tiosulfata 0,1 mol/l.

Rezultat se iskazuje kao postotak udjela bezvodne laktoze u uzorku.

7. **Napomena**

1. Za proizvode koji sadržavaju više od 40 % fermentiranog šećera koristi se više od 5 ml suspenzije kvasca (točka 3.1.).
2. U hrani za životinje sa smanjenim udjelom laktoze (npr. mlijeko za mačke) laktoza se pretvara u fruktozu, koja se ne fermentira potpuno u roku od 2 sata i zbog toga se dobiju viši ili lažno pozitivni rezultati (jer ostaci fruktoze ostaju u ekstraktu).

Tablica vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa

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

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, inver- tirani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14

▼ **M9**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, inver- tirani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	ml
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. ODREĐIVANJE ŠKROBA**POLARIMETRIJSKA METODA****1. Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje razine škroba i produkata razgradnje škroba velike molekulske mase u hrani za životinje za provjeru usklađenosti s deklariranom energetsom vrijednosti (odredbe iz Priloga VII.) i Uredbom (EZ) br. 767/2009.

Ovu metodu treba primjenjivati za određivanje udjela škroba za izračun energetske vrijednosti hrane za životinje.

Ako se udio škroba određuje za druge svrhe, mogu se koristiti druge analitičke metode.

2. Načelo

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

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

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

3. Reagensi

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

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

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

3.3. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata Zn (CH₃COO)₂ 2H₂O i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

▼ M9

3.4. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijeveg ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

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

4. Oprema

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

4.2. Polarimetar ili saharimetar.

5. Postupak**5.1. Priprema uzorka**

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

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

Odvagne se 2,5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u građiranu tikvicu obujma 100 ml. Doda se 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.2.), protrese tako da se testni uzorak ravnomjerno raspodijeli i doda još 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.2.). Tikvica se stavi u proključalu vodu kupelj i prve tri minute snažno i ravnomjerno trese kako bi se spriječilo nastajanje aglomerata. U vodenoj kupelji mora biti toliko vode da kada se u nju stavi tikvica kupelj ostane na točki ključanja. Tikvica se tijekom tresenja ne smije vaditi iz kupelji. Nakon točno 15 minuta, tikvica se izvadi iz kupelji, doda se 30 ml hladne vode i odmah ohladi na 20 °C.

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

Polarimetrom ili saharimetrom se izmjeri optička rotacija otopine u epruveti od 200 mm.

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

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg, prenese u građiranu tikvicu volumena 100 ml i doda približno 80 ml etanola (točka 3.5.) (vidjeti napomenu pod točkom 7.2.). Tikvica se ostavi 1 sat na sobnoj temperaturi; u tom se vremenu šest puta snažno protrese kako bi se testni uzorak temeljito promiješao s etanolom. Volumen se dopuni etanolom (točka 3.5.), promiješa i filtrira.

Pipetom se prenese 50 ml filtrata (što odgovara 2,5 g uzorka) u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 ml, doda se 2,1 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.) i snažno protrese. Na Erlenmeyerovu tikvicu se priključujući povratno hladilo i tikvica se uroni u proključalu vodu kupelj. Nakon točno 15 minuta, Erlenmeyerova se tikvica izvadi iz kupelji, a njezin sadržaj prenese u građiranu tikvicu volumena 100 ml, ispere s malo hladne vode i ohladi na 20 °C.

▼ M9

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

6. Izračun rezultata

Udio škroba (%) izračunava se na sljedeći način:

6.1. Mjerenje polarimetrom

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

P = ukupna optička rotacija u kutnim stupnjevima

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

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

+ 185,9: rižin škrob

+ 185,7: krumpirov škrob

+ 184,6: kukuruzni škrob

+ 182,7: pšenični škrob

+ 181,5: ječmeni škrob

+ 181,3: zobeni škrob

+ 184,0: druge vrste škroba i škrobnih mješavina u krmnim smjesama.

6.2. Mjerenje saharimetrom

$$\text{Udio škroba (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2\,N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

S = ukupna optička rotacija u stupnjevima saharimetra

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

N = masa (g) saharoze u 100 ml vode s optičkom rotacijom 100 saharimetarskih stupnjeva kada se mjeri koristeći epruvetu od 200 mm

16,29 g za francuske saharimetre

26,00 g za njemačke saharimetre

20,00 g za kombinirane saharimetre

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = specifična optička rotacija čistog škroba (vidjeti točku 6.1.)

▼ M9**6.3. Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 0,4 apsolutne vrijednosti za udio škroba manji od 40 % i 1 % relativne vrijednosti za udio škroba jednak ili veći od 40 %.

7. Napomene

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

7.2. Kod proizvoda s visokim udjelom laktoze, poput mliječnog seruma u prahu ili obranog mlijeka u prahu, nakon dodavanja 80 ml etanola (točka 3.5.) postupi se na sljedeći način. Na tikvicu se priključi povratno hladilo i tikvica se 30 minuta drži u vodenoj kupelji na 50 °C. Ostavi se ohladiti i nastavi s analizom u skladu s točkom 5.3.

7.3. Sljedeća krmiva, kada su u znatnoj količini prisutna u hrani za životinje, smatraju se uzrokom smetnji pri određivanju udjela škroba polarimetrijskom metodom, što može dovesti do netočnih rezultata:

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

— pulpa citrusa,

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

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

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

— kokosova pogača; kokosova sačma (kopra),

— pulpa krumpira,

— suhi kvasac,

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

— čvarci,

— proizvodi od soje.

U ovim se slučajevima može koristiti analitička metoda iz Uredbe Komisije (EZ) br. 121/2008⁽¹⁾. Ta se metoda može koristiti i za hranu za životinje s udjelom škroba manjim od 1 %.

⁽¹⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 121/2008 od 11. veljače 2008. o utvrđivanju metode analize za određivanje sadržaja škroba u pripravcima koje se rabi za hranidbu životinja (oznaka KN 2309) (SL L 37, 12.2.2008., str. 3.).

▼ M9**L. ODREĐIVANJE SIROVOG PEPELA**

1. **Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje udjela sirovog pepela u hrani za životinje.
2. **Načelo**

Uzorak se spali na 550 °C; ostatak se izvaže.
3. **Reagensi**

Amonijev nitrat, 20 % otopina (w/v).
4. **Oprema**
 - 4.1. Grijaća ploča.
 - 4.2. Električna mufolna peć s termostatom.
 - 4.3. Lončići za spaljivanje od kvarcnog stakla, porculana ili platine, pravokutni (približno 60 × 40 × 25 mm) ili okrugli (promjer: 60 do 75 mm, visina: 20 do 40 mm).
5. **Postupak**

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

 - 5.1. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. Ostavi se na toj temperaturi sve do nastanka bijelog, svjetlosivog ili crvenkastog pepela koji izgleda kao da ne sadržava karbonatne čestice. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se ohladiti i odmah izvaže.
 - 5.2. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. U peći se spaljuje 3 sata. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se ohladiti i odmah izvaže. Ponovo se 30 minuta spaljuje kako bi se osiguralo da je masa pepela konstantna (gubitak mase između dva uzastopna vaganja ne smije prijeći 1 mg).
6. **Izračun rezultata**

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.
7. **Napomene**
 - 7.1. *Tvari koje se teško spaljuju* moraju se izložiti prvom spaljivanju u trajanju od najmanje tri sata, zatim se ohlade i dodaje im se nekoliko kapi 20 % otopine amonijevog nitrata ili vode (oprezno, kako bi se spriječilo raspršivanje pepela ili nastanak gruda). Nakon sušenja u sušioniku nastavi se sa spaljivanjem. Postupak se prema potrebi ponovi, sve do potpunog spaljivanja.
 - 7.2. Kod *tvari koje su otporne na obradu* iz točke 7.1. postupa se na sljedeći način: nakon trosatnog spaljivanja, pepeo se prenese u toplu vodu i filtrira kroz mali filter slobodan od pepela. Filter i njegov sadržaj se spale u istom lončiću. Filtrat se prenese u ohlađen lončić, otpari do suhog, spali i izvaže.
 - 7.3. Kod ulja i masti, točno se izvaže uzorak od 25 g u lončić prikladne veličine. Karbonizira se tako da se tvar zapali vrpcom od filteraskog papira slobodnog od pepela. Nakon spaljivanja navlaži se što je moguće manjom količinom vode. Osuši se i spali u skladu s točkom 5.

▼ **M9****M. ODREĐIVANJE PEPELA NETOPLJIVOG U KLOROVO-
DIČNOJ KISELINI****1. Svrha i područje primjene**

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

1.1. *Metoda A:* koristi se za organska krmiva i većinu krmnih smjesa;

1.2. *Metoda B:* koristi se za mineralna krmiva, mineralne mješavine i krmne smjese koje, prema metodi A, sadržavaju više od 1 % tvari netopljivih u klorovodičnoj kiselini.

2. Načelo

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

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

3. Reagensi

3.1. Klorovodična kiselina, 3 mol/l.

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

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

4. Oprema

4.1. Grijaća ploča.

4.2. Električna mufolna peć s termostatom.

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

4.4. Filtri slobodni od pepela

5. Postupak**5.1. Metoda A**

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

Pepeo se prenese u čašu volumena 250 ml do 400 ml sa 75 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.). Polako se zagrije do ključanja i 15 minuta ostavi lagano ključati. Topla otopina se filtrira kroz filterski papir slobodan od pepela, ostatak se ispire toplom vodom sve do prestanka kisele reakcije. Filtar s ostatkom i pepelom se osuši u tariranom lončiću na temperaturi koja nije niža od 550 °C ni viša od 700 °C. Ostavi se ohladiti u eksikatoru te se izvaže.

5.2. Metoda B

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u čašu obujma 250 – 400 ml. Doda se 25 ml vode, zatim 25 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.), promiješa i pričekava da se reakcija umiri. Doda se još 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.). Pričekava se dok potpuno ne prestane ispuštanje plina, zatim se čaša stavi u proključalu vodu kupelj i tamo drži 30 minuta ili prema potrebi dulje kako bi se potpuno hidrolizirao sav eventualno prisutni škrob. Filtrira se dok je topao kroz filter slobodan od pepela, a filter se ispire s 50 ml tople vode (vidjeti napomenu pod točkom 7.). Filtar s ostatkom prenese se u lončić za

▼ M9

spaljivanje, osuši i spali na temperaturi koja nije niža od 550 °C ni viša od 700 °C. Pepeo se prenese u čašu volumena 250 ml do 400 ml sa 75 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.); nastavi se kako je opisano u drugom odlomku točke 5.1.

6. Izračun rezultata

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

7. Napomena

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

N. ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA

Ukupni fosfor određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, željeza, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, sumpora, željeza, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod tlakom, ili
- fotometrijskom metodom, kako je opisano u nastavku.

FOTOMETRIJSKA METODA**1. Svrha i područje primjene**

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

2. Načelo

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

3. Reagensi

- 3.1. Kalcijev karbonat.
- 3.2. Klorovodična kiselina, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (približno 6 mol/l).
- 3.3. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,38$ do 1,42 g/ml.
- 3.5. Sumporna kiselina, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6. Molibdovanadat: u graduiranoj tikvici volumena 1 l pomiješa se 200 ml otopine amonijevog heptamolibdata (točka 3.6.1.), 200 ml otopine amonijevog monovanadata (točka 3.6.2.) i 134 ml dušične kiseline (točka 3.4.). Volumen se dopuni vodom.

▼ M9

- 3.6.1. Otopina amonijevog heptamolibdata: u vrućoj se vodi otopi 100 g amonijevog heptamolibdata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Doda se 10 ml amonijaka (gustoća 0,91 g/ml) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.6.2. Otopina amonijevog monovanadata: u 400 ml vruće vode otopi se 2,35 g amonijevog monovanadata NH_4VO_3 . Uz stalno miješanje polako se dodaje 20 ml razrijeđene dušične kiseline (7 ml HNO_3 (točka 3.4.) + 13 ml H_2O) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.7. Standardna otopina 1 mg fosfora na ml: u vodi se otopi 4,387 g kalijevog dihidrogen fosfata (KH_2PO_4). Dopuni se vodom do 1 litre.

4. Oprema

- 4.1. Lončići za spaljivanje od kvarcnog stakla, porculana ili platine.
- 4.2. Električna mufolna peć s termostatom postavljenim na 550 °C.
- 4.3. Kjeldahlova tikvica volumena 250 ml.
- 4.4. Graduirane tikvice i precizne pipete.
- 4.5. Spektrofotometar.
- 4.6. Epruvete promjera približno 16 mm, s brušenim čepovima promjera 14,5 mm, volumena 25 – 30 ml.

5. Postupak**5.1. Priprema otopine**

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

5.1.1. Standardni postupak

Odvagne se 1 g uzorka ili više s preciznošću od 1 mg. Testni uzorak se prenese u Kjeldahlovu tikvicu, doda se 20 ml sumporne kiseline (točka 3.5.) i protrese kako bi se uzorak u potpunosti natopio kiselinom i spriječio njegovo prianjanje na stijenke tikvice, zatim se zagrije i ostavi ključati 10 minuta. Ostavi se ohladiti, doda se 2 ml dušične kiseline (točka 3.4.), lagano se zagrije, malo se ohladi, doda se još malo dušične kiseline (točka 3.4.) i ponovo zagrije do ključanja. Postupak se ponavlja sve dok se ne dobije bezbojna otopina. Ohladi se, doda malo vode, tekućina se odlije u graduiranu tikvicu volumena 500 ml, a Kjeldahlova tikvica se ispere vrućom vodom. Ostavi se ohladiti, volumen se dopuni vodom, homogenizira i filtrira.

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

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

▼ M9**5.2. Nastanak obojenja i mjerenje optičke gustoće**

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

5.3. Kalibracijska krivulja

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

6. Izračun rezultata

Količina fosfora u testnom uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

— 3 % višeg rezultata za udio fosfora niži od 5 %,

— 0,15 % apsolutne vrijednosti za udio fosfora od 5 % ili više.

O. ODREĐIVANJE KLORA IZ KLORIDA**1. Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje količine klora u kloridima topljivima u vodi koji se uobičajeno iskazuju kao natrijev klorid. Koristi se za svu hranu za životinje.

2. Načelo

Kloridi se otope u vodi. Ako proizvod sadržava organske tvari, koristi se postupak bistranja. Otopina se lagano zakiseli dušičnom kiselinom, a kloridi istalože otopinom srebrnog nitrata u obliku srebrnog klorida. Suvišak srebrnog nitrata titrira se otopinom amonijevog tiocijanata po Volhardovoj metodi.

3. Reagensi

3.1. Otopina amonijevog tiocijanata, 0,1 mol/litra.

3.2. Otopina srebrnog nitrata, 0,1 mol/l.

3.3. Zasićena otopina amonij-željezo (III) sulfata (NH₄)Fe(SO₄)₂.

3.4. Dušična kiselina, gustoća: 1,38 g/ml.

▼ M9

- 3.5. Dietil eter.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.8. Otopina Carrez II: u vodi se otopi 10,6 g kalijevog ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.9. Aktivni ugljen koji ne sadržava kloride niti ih apsorbira.

4. Oprema

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

5. Postupak**5.1. Priprema otopine**

Uzimajući u obzir prirodu uzorka, otopina se pripravlja kako je opisano u točki 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3.

Istodobno se izvodi slijepa proba bez uzorka koji se analizira.

5.1.1. Uzorci bez organskih tvari

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

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

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

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

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

5.2. Titracija

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

▼ M9**6. Izračun rezultata**

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

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

pri čemu je:

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

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

m = g mase uzorka u alikvotu.

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

7. Napomene

- 7.1. Titracija se može izvršiti i potenciometrijskom ili amperometrijskom titracijom.
- 7.2. Proizvodi bogati uljima i mastima prvo se odmaste dietil eterom ili petroleterom.
- 7.3. U slučaju ribljeg brašna, titracija se može izvršiti Mohrovom metodom.

▼ **M9***PRILOG IV.***ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU KOLIČINE ODOBRENIH
DODATAKA HRANI ZA ŽIVOTINJE****A. ODREĐIVANJE VITAMINA A**

Vitamin A određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17547 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje sadržaja vitamina A, E i D ⁽¹⁾ – Pročišćavanje metodom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE) i metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), ili
- tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC) uz upotrebu UV ili fluorescencijskog detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 9.

1. Svrha i područje primjene

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

Granica kvantifikacije je 2 000 IU vitamina A/kg.

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijevog hidroksida, a vitamin A se ekstrahira petroleterom. Otapalo se ukloni otparivanjem, a ostatak otopi u metanolu i prema potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina A određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC) uz upotrebu UV ili fluorescencijskog detektora. Odaberu se oni kromatografski parametri koji omogućuju da se *all-trans*-vitamin A alkohol i njegovi *cis* izomeri ne razdvoje.

3. Reagensi

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petroleter, vrelište 40–60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (vidjeti napomene pod točkom 7.7.)
- 3.6. Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ u glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (za $x = 9$) (vidjeti napomene pod točkom 7.8.)
- 3.7. Otopina fenolftaleina, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ u etanolu (točka 3.1.)

⁽¹⁾ Analitička metoda utvrđena u normi EN 17547 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje vitamina A i E umjesto metode opisane u dijelu A ovog Priloga za određivanje vitamina A i dijelu B ovog Priloga za određivanje vitamina E.

▼ **M9**

- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mobilna faza za HPLC: Smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. $980 + 20$ (v + v) Točan se omjer određuje u skladu s osobinama korištene kolone.
- 3.10. Dušik, bez kisika
- 3.11. All-*trans*-vitamin A acetat, posebne čistoće, certificirane aktivnosti, npr. $2,80 \times 10^6$ IU/g.
 - 3.11.1. Temeljna otopina all-*trans*-vitamin A acetata: Odvagne se 50 mg vitamin A acetata (točka 3.11.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu volumena 100 ml. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8.) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 1 400 IU vitamina A na ml. Točan se udio određuje u skladu s točkom 5.6.3.1.
- 3.12. All-*trans*-vitamin A palmitat, posebne čistoće, certificirane aktivnosti, npr. $1,80 \times 10^6$ IU/g.
 - 3.12.1. Temeljna otopina all-*trans*-vitamin A palmitata: Odvagne se 80 mg vitamin A palmitata (točka 3.12.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu volumena 100 ml. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8.) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 1 400 IU vitamina A na ml. Točan se udio određuje u skladu s točkom 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (vidjeti napomenu pod točkom 7.5.)

4. **Oprema**

- 4.1. Rotacijski vakuum otparivač
- 4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla
 - 4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, obujma 500 ml, s ubrušenim vratom
 - 4.2.2. Građirane tikvice s ubrušenim čepovima, s uskim vratom, volumena 10, 25, 100 i 500 ml
 - 4.2.3. Lijevci za odjeljivanje, konusni, 1 000 ml, s ubrušenim čepovima
 - 4.2.4. Kruškolike tikvice, volumena 250 ml, s čepovima od brušenog stakla
- 4.3. Allihnovo hladilo, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina
- 4.4. Nabrani filtarski papir za razdvajanje faza, promjera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje
 - 4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica 5 ili 10 µm, ili ekvivalentna (mjerilo učinkovitosti: samo jedan pik za sve izomere retinola u uvjetima za HPLC)
 - 4.5.2. UV ili fluorescencijski detektor s mogućnošću promjene valne duljine
- 4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kivetama od 10 mm
- 4.7. Vodena kupelj s magnetnom miješalicom
- 4.8. Naprava za ekstrakciju (vidjeti sliku 1.) koja se sastoji od:

▼ **M9**

4.8.1. staklenog valjka volumena od 1 litre s vratom i čepom od brušenog stakla;

4.8.2. uloška od brušenog stakla s bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz sredinu. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tekućine u valjku može prenijeti u lijevak za odjeljivanje.

5. **Postupak**

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

5.1. *Priprema uzorka*

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine očice 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje topline. Mljevenje se mora izvršiti neposredno prije vaganja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina A. Uzorke ne mljeti ako je raspodjela veličina čestica primjerena (npr. u slučaju premiksa i dodataka hrani za životinje).

5.2. *Saponifikacija*

Ovisno o sadržaju vitamina A, odvagane se 2 – 25 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu volumena 500 ml (točka 4.2.1.). U slučaju niskih koncentracija masa uzorka može se povećati kako bi testni dio sadržavao dovoljno čestica. Uz stalno vrtloženje, jedno za drugim dodaje se 130 ml etanola (točka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (točka 3.13.), 2 ml otopine natrijevog askorbata (točka 3.5.) i 2 ml otopine natrijevog sulfida (točka 3.6.). Na tikvicu se priključi kondenzator (točka 4.3.) i tikvica stavi u vodenu kupelj s magnetnom miješalicom (točka 4.7.). Zagrije se do ključanja i pet minuta ostavi uz refluks. Kroz kondenzator (točka 4.3.) doda se 25 ml otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4.) i ostavi uz refluks sljedećih 25 minuta, uz miješanje u laganoj struji dušika. Zatim se kondenzator ispere s približno 20 ml vode, a sadržaj tikvice ohladi na sobnu temperaturu.

5.3. *Ekstrakcija*

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

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3.)

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

Pomiješani ekstrakti u lijevku za odjeljivanje isperu se dvaput sa 100 ml vode, uz lagano vrtloženje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano protresivanjem s dodatnim obrocima od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju otopine fenolftaleina (točka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično su dovoljna četiri ispiranja). Isprani se ekstrakt filtrira kroz suhi nabrani filtar za razdvajanje faza

▼ **M9**

(točka 4.4.) u građuiranu tikvicu volumena 500 ml (točka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odjeljivanje i filter se isperu s 50 ml petroletera (točka 3.2.), dopuni se petroleterom (točka 3.2.) do oznake i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8.)

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

Pomiješani ekstrakti petroletera se isperu kako je opisano u točki 5.3.1., zatim se nastavi u skladu s tom točkom.

5.4. Priprema otopine uzorka za HPLC

Alikvotni dio otopine petroletera (iz točke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškoliku tikvicu volumena 250 ml (točka 4.2.4.). Otapalo se otpari skoro do suhog u rotacijskom otparivaču (točka 4.1.) pri sniženom tlaku i temperaturi kupelji do 40 °C. Dovođenjem dušika uspostavi se atmosferski tlak (točka 3.10.), a tikvica se izvadi iz rotacijskog otparivača. Preostalo se otapalo ukloni u struji dušika (točka 3.10.), a ostatak odmah otopi u poznatom volumenu (10 – 100 ml) metanola (točka 3.3.) (koncentracija vitamina A mora biti u rasponu od 5 IU/ml do 30 IU/ml).

5.5. HPLC određivanje

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

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

Uvjeti za HPLC

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

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

Mobilna faza (točka 3.9.):	Smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. 980 + 20 (v + v).
----------------------------	---

Brzina protoka:	1 – 2 ml/min
-----------------	--------------

Detektor (točka 4.5.2.):	UV detektor (325 nm) ili fluorescencijski detektor (ekscitacija: 325 nm/emisija: 475 nm)
--------------------------	--

▼ **M9**5.6. *Kalibracija*

5.6.1. Priprema radnih standardnih otopina

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

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

5.6.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje

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

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

5.6.3. UV standardizacija standardnih otopina

5.6.3.1. Temeljna otopina vitamin A acetata

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

Izračun udjela vitamina A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^1 \text{ za vitamin A acetat} = 1\,530 \text{ na } 326 \text{ nm u } 2\text{ – propanolu})$$

5.6.3.2. Temeljna otopina vitamin A palmitata

Pipetom se prenese 2,0 ml temeljne otopine vitamin A palmitata (točka 3.12.1.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml (točka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ove otopine je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ove

▼ M9

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

Izračun udjela vitamina A:

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

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

5.6.3.3. Radna standardna otopina vitamina A

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

Izračun udjela vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

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

6. Izračun rezultata

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

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

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

pri čemu je:

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

V₁ = volumen otopine uzorka (točka 5.4.) u ml;

V₂ = volumen alikvota korištenog u točki 5.4., u ml;

m = masa testnog dijela u gramima.

7. Napomene

- 7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina A može biti korisno pomiješati ekstrakte petroletera iz dvije serija za saponifikaciju (izvaga količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za HPLC određivanje.

▼M9

- 7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.
- 7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (točka 3.1.) za razbijanje emulzije.
- 7.4. Kod ulja iz jetre bakalara i drugih čistih masti trajanje saponifikacije treba produžiti na 45 – 60 minuta.
- 7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrokinon.
- 7.6. Izomere retinola moguće je razdvojiti običnom faznom kolonom. U ovom slučaju za izračune se zbrajaju visine (površine) pika svih cis i trans izomera.
- 7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.
- 7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.
- 7.9. Pri analizi vitamina A u mliječnim zamjenicama treba paziti na sljedeće:
- kod saponifikacije (točka 5.2.): zbog količine masti u uzorku može biti potrebna veća količina otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4.),
 - kod ekstrakcije (točka 5.3.): zbog prisutnosti emulzija može biti potrebno prilagoditi omjer voda/etanol 2:1.

Za provjeru pouzdanosti rezultata dobivenih korištenom analitičkom metodom na ovoj specifičnoj matrici (mliječna zamjenica) treba na dodatnom testnom dijelu provesti test iskorištenja. Ako je iskorištenje manje od 80 %, rezultat analize treba korigirati za iskorištenje.

8. **Ponovljivost**

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 15 % višeg rezultata.

9. **Rezultati međulaboratorijske studije ⁽¹⁾**

	Premiks	Dopunske krmne smjese	Mineralni koncentrat	Proteinske dopunske krmne smjese	Krmne smjese za prasad
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Srednja vrijednost [IU/kg]	17,02 x 106	1,21 x 106	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	0,51 x 106	0,039 x 106	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 x 106	0,109 x 106	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	1,36 x 106	0,069 x 106	46 300	23 060	3 614

⁽¹⁾ Određivanje je provela radna skupina za hranu za životinje Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ M9

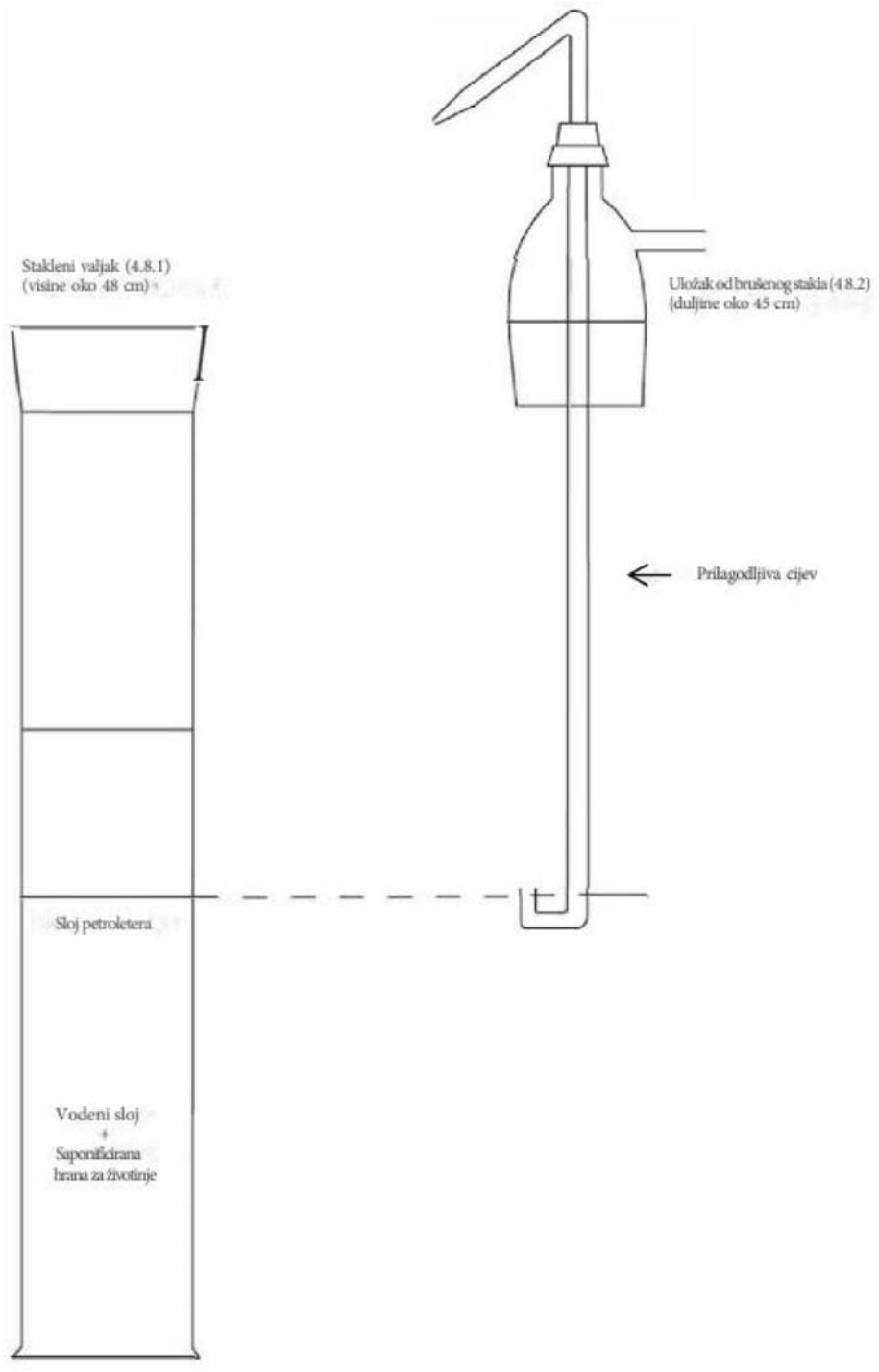
	Premiks	Dopunske krmne smjese	Mineralni koncentrat	Proteinske dopunske krmne smjese	Krmne smjese za prasad
R [IU/kg]	3,81 x 106	0,193 x 106	129 640	64 568	10 119
CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: broj laboratorija
n: broj pojedinačnih vrijednosti
sr: standardna devijacija ponovljivosti
sR: standardna devijacija obnovljivosti
r: ponovljivost
R: obnovljivost
CVr: koeficijent varijacije ponovljivosti
CVR: koeficijent varijacije obnovljivosti

▼ M9

Sliku 1.

Napravu za ekstrakciju (točka 4.8.)



▼ **M9****B. ODREĐIVANJE VITAMINA E**

Vitamin E određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17547 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje sadržaja vitamina A, E i D ⁽¹⁾ – Pročišćavanje metodom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE) i metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), ili
- tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC) uz upotrebu UV ili fluorescencijskog detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 9.

1. Svrha i područje primjene

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

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

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijevog hidroksida, a vitamin E se ekstrahira petroleterom. Otapalo se ukloni otparivanjem, a ostatak otopi u metanolu i prema potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina E određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC) uz upotrebu UV ili fluorescencijskog detektora.

3. Reagensi

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Petroleter, vrelište 40 – 60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (vidjeti napomene pod točkom 7.7.)
- 3.6. Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
- 3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ u glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (za $x = 9$) (vidjeti napomene pod točkom 7.8.)
- 3.7. Otopina fenolftaleina, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ u etanolu (točka 3.1.)
- 3.8. Mobilna faza za HPLC: Smjesa metanola (točka 3.3.) i vode, npr. $980 + 20 (v + v)$ Točan se omjer određuje u skladu s osobinama korištene kolone.
- 3.9. Dušik, bez kisika
- 3.10. DL- α -tokoferol acetat, posebne čistoće, certificirane aktivnosti

⁽¹⁾ Analitička metoda utvrđena u normi EN 17547 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje vitamina A i E umjesto metode opisane u dijelu A ovog Priloga za određivanje vitamina A i dijelu B ovog Priloga za određivanje vitamina E.

▼M9

3.10.1. Temeljna otopina DL- α -tokoferol acetata: odvagane se 100 mg DL- α -tokoferol acetata (točka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 100 ml. Otopi se u etanolu (točka 3.1.) i dopuni istim otapalom do oznake. 1 ml te otopine sadržava 1 mg DL- α -tokoferol acetata. (Za UV kontrolu vidjeti točku 5.6.1.3.; za stabilizaciju vidjeti napomenu pod točkom 7.4.).

3.11. DL- α -tokoferol, posebne čistoće, certificirane aktivnosti.

3.11.1. Temeljna otopina DL- α -tokoferola: odvagane se 100 mg DL- α -tokoferola (točka 3.11.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 100 ml. Otopi se u etanolu (točka 3.1.) i dopuni istim otapalom do oznake. 1 ml te otopine sadržava 1 mg DL- α -tokoferola. (Za UV kontrolu vidjeti točku 5.6.2.3.; za stabilizaciju vidjeti napomenu pod točkom 7.4.).

3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (vidjeti napomenu pod točkom 7.5.)

4. Oprema

4.1. Tankoslojni rotacijski otparivač

4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla

4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, obujma 500 ml, s ubrušenim vratom

4.2.2. Građuirane tikvice s ubrušenim čepovima, s uskim vratom, volumena 10, 25, 100 i 500 ml

4.2.3. Lijevci za odjeljivanje, konusni, 1 000 ml, s ubrušenim čepovima

4.2.4. Kruškolike tikvice, volumena 250 ml, s čepovima od brušenog stakla

4.3. Allihnovo hladilo, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina

4.4. Nabrani filtarski papir za razdvajanje faza, promjera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje

4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica 5 ili 10 μ m, ili ekvivalentna

4.5.2. UV ili fluorescencijski detektor s mogućnošću promjene valne duljine

4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kivetama od 10 mm

4.7. Vodena kupelj s magnetnom miješalicom

4.8. Naprava za ekstrakciju (vidjeti sliku 1.) koja se sastoji od:

4.8.1. staklenog valjka volumena od 1 litre s vratom i čepom od brušenog stakla;

4.8.2. uloška od brušenog stakla s bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz sredinu. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tekućine u valjku može prenijeti u lijevak za odjeljivanje.

▼ **M9****5. Postupak**

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

5.1. Priprema uzorka

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

5.2. Saponifikacija

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

5.3. Ekstrakcija

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

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3.)

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

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

5.3.2. Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8.)

Kada se slojevi odijele (vidjeti napomenu pod točkom 7.3.), čep staklenog valjka zamijeni se (točka 4.8.1.) uloškom od brušenog stakla (točka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi se odmah iznad razine veznog sklopa. Tlakom koji tvori dušik u bočnoj ručici gornji se sloj petroletera prenese u lijevak za odjeljivanje kapaciteta 1 000 ml (točka 4.2.3.). U stakleni se valjak doda 100 ml petroletera (točka 3.2.), začepi i dobro protrese. Pričeka se

▼ **M9**

do razdvajanja slojeva te se gornji sloj prenese u lijevak za odjeljivanje kao prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml petroletera (točka 3.2.), zatim dvaput s 50 ml petroletera (točka 3.2.), a slojevi petroletera dodaju se u lijevak za odjeljivanje.

Pomiješani ekstrakti petroletera se isperu kako je opisano u točki 5.3.1., zatim se nastavi u skladu s tom točkom.

5.4. *Priprema otopine uzorka za HPLC*

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

5.5. *HPLC određivanje*

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

Injektira se alikvotni dio (npr. 20 μ l) otopine metanola dobivene u točki 5.4. i eluira mobilnom fazom (točka 3.8.). Izračuna se srednja vrijednost visina (površina) pika za više injektiranja iste otopine uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pika za više injektiranja kalibracijskih otopina (točka 5.6.2.).

Uvjeti za HPLC

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju 250 mm × 4 mm, C18, veličina čestica 5 μ m ili 10 μ m, ili ekvivalentna (točka 4.5.1.):

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

Brzina protoka: 1 – 2 ml/min

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

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

5.6.1. *Standard DL- α -tokoferol acetata*

5.6.1.1. *Priprema radne standardne otopine*

Pipetom se prenese 25 ml temeljne otopine DL- α -tokoferol acetata (točka 3.10.1.) u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu volumena 500 ml (točka 4.2.1.) i hidrolizira, u skladu s točkom 5.2. Zatim se ekstrahira s petroleterom (točka 3.2.) u skladu s točkom 5.3. i dopuni petroleterom do 500 ml. U rotacijskom se otparivaču (vidjeti točku 5.4.) otpari 25 ml tog ekstrakta gotovo do suhog, u struji dušika ukloni

▼M9

preostalo otapalo (točka 3.9.), a ostatak se ponovo otopi u 25,0 ml metanola (točka 3.3.). Nominalna koncentracija ove otopine iznosi 45,5 µg DL-α-tokoferola na ml, što je ekvivalentno 50 µg DL-α-tokoferol acetata na ml. Radna standardna otopina priprema se svježa prije uporabe.

5.6.1.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje

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

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

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

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

Maksimalna apsorpcija treba biti na 284 nm:

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

Za to se razrjeđenje mora dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,84 do 0,88.

5.6.2. Standard DL-α-tokoferola

5.6.2.1. Priprema radne standardne otopine

Pipetom se prenese 2 ml temeljne otopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1.) u građuiranu tikvicu volumena 50 ml, otopi u metanolu (točka 3.3.) i dopuni do oznake metanolom. Nominalna koncentracija te otopine iznosi 40 µg DL-α-tokoferola na ml, što je ekvivalentno 44,0 µg DL-α-tokoferol acetata na ml. Radna standardna otopina priprema se svježa prije uporabe.

5.6.2.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radne standardne otopine u seriju građuiranih tikvica volumena 20 ml, dopuni metanolom do oznake (točka 3.3.) i promiješa. Nominalne koncentracije tih otopina iznose 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg/ml DL-α-tokoferola, tj. 2,20, 4,40, 8,79 µg/ml i 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol acetata.

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

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

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

▼ M9

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

Za to se razrjeđenje mora dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,6.

6. Izračun rezultata

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

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

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

pri čemu je:

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

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

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

m = masa testnog dijela u gramima.

7. Napomene

- 7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina E može biti korisno pomiješati ekstrakte petroletera iz dvije serije za saponifikaciju (izvaga količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za HPLC određivanje.
- 7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.
- 7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (točka 3.1.) za razbijanje emulzije.
- 7.4. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja otopine DL- α -tokoferol acetata ili otopine DL- α -tokoferola u skladu s točkom 5.6.1.3. ili 5.6.2.3., doda se približno 10 mg BHT-a (točka 3.12.) u otopinu (točka 3.10.1. ili 3.10.2.), a otopina pohrani u hladnjaku (može se držati najviše 4 tjedna).
- 7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrokinon.
- 7.6. Običnom faznom kolonom može se odijeliti α -, β -, γ - i δ -tokoferol.
- 7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.
- 7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.
- 7.9. Vitamin E acetat se u alkalnim uvjetima vrlo brzo hidrolizira, zato je vrlo osjetljiv na oksidaciju, osobito u prisutnosti elemenata u tragovima kao što su željezo i bakar. U slučaju određivanja vitamina E u premiksima u količinama većim od 5 000 mg/kg može doći do razgradnje vitamina E. Zbog toga se za potvrdu preporučuje metoda HPLC s enzimskom razgradnjom struktura vitamina E bez alkalne saponifikacije.

▼ M9

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 15 % višeg rezultata.

9. Rezultati međulaboratorijske studije ⁽¹⁾

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

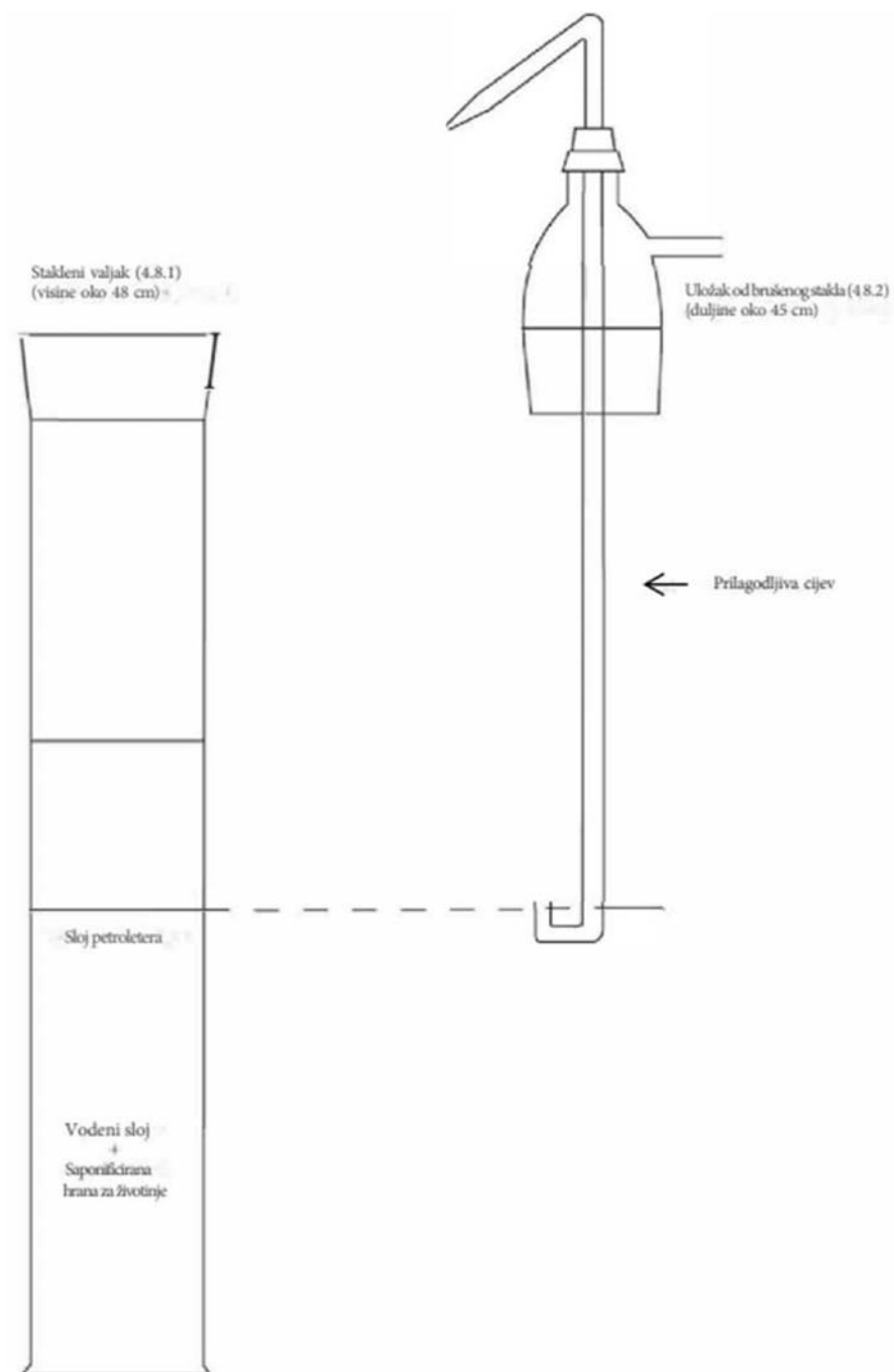
L:	broj laboratorija
n:	broj pojedinačnih vrijednosti
s _r :	standardna devijacija ponovljivosti
s _R :	standardna devijacija obnovljivosti
r:	ponovljivost
R:	obnovljivost
CV _r :	koeficijent varijacije ponovljivosti
CV _R :	koeficijent varijacije obnovljivosti

⁽¹⁾ Određivanje je provela radna skupina za hranu za životinje Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ **M9**

Sliku 2.

Napravu za ekstrakciju (točka 4.8.)



▼ M9**C. ODREĐIVANJE ŽELJEZA, BAKRA, MANGANA I CINKA U TRAGOVIMA**

Udio željeza, bakra, mangana i cinka određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, željeza, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, sumpora, željeza, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod tlakom, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17053 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje elemenata u tragovima, teških metala i ostalih elemenata u hrani metodom ICP-MS (multimetoda), ili
- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN ISO 6869 Hrana za životinje: Određivanje udjela kalcija, bakra, željeza, magnezija, mangana, kalija, natrija i cinka – Metoda u kojoj se upotrebljava atomska apsorpcijska spektrometrija, ili
- metodom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (FAAS), kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku.

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje željeza, bakra, mangana i cinka u tragovima u hrani za životinje ⁽¹⁾. Granice kvantifikacije su:

- željezo (Fe): 20 mg/kg
- bakar (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- cink (Zn): 20 mg/kg

2. Načelo

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

3. Reagensi*Uvodne napomene*

Za pripremu reagensa i otopina za analizu koristi se voda bez kationa koje treba odrediti, dobivena redestilacijom vode u destilatoru od boro-silikatnog ili kvarcnog stakla ili dvostrukom obradom ionsko-izmjenjivačkom smolom.

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

⁽¹⁾ Ta je metoda validirana međulaboratorijskim ispitivanjem za različite matrice hrane za životinje. Dodatne informacije dostupne su na: <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

▼ **M9**

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

- 3.1. Klorovodična kiselina (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Klorovodična kiselina (6 mol/l).
- 3.3. Klorovodična kiselina (0,5 mol/l).
- 3.4. Fluorovodična kiselina 38 – 40 % (v/v) s udjelom željeza (Fe) manjim od 1 mg/l i ostatkom nakon otparivanja manjim od 10 mg/l (u obliku sulfata).
- 3.5. Sumporna kiselina. (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Vodikov peroksid. (približno 100 volumnih dijelova kisika (30 % po masi)).
- 3.7. Standardna otopina željeza (1 000 µg Fe/ml), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina: otopi se 1 g željezne žice u 200 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.), doda 16 ml vodikovog peroksida (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.
 - 3.7.1. Radna standardna otopina željeza (100 µg Fe/ml), pripravljena razrjeđivanjem jednog dijela standardne otopine (točka 3.7.) s devet dijelova vode.
- 3.8. Standardna otopina bakra (1 000 µg Cu/ml), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:
 - otopi se 1 g bakra u prahu u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.), doda 5 ml vodikovog peroksida (točka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.8.1. Radna standardna otopina bakra (10 µg Cu/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.8.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.
- 3.9. Standardna otopina mangana (1 000 µg Mn/ml), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:
 - otopi se 1 g mangana u prahu u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.9.1. Radna standardna otopina mangana (10 µg Mn/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.9.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.
- 3.10. Standardna otopina cinka (1 000 µg Zn/ml), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:
 - otopi se 1 g cinka u foliji ili listićima u 25 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.
- 3.10.1. Radna standardna otopina cinka (10 µg Zn/ml), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.10.) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.
- 3.11. Otopina lantanovog klorida: otopi se 12 g lantanovog oksida u 150 ml vode, doda se 100 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litre.

▼ **M9****4. Oprema**

- 4.1. Mufolna peć s regulacijom temperature i po mogućnosti zapisivačem.
- 4.2. Stakleni dijelovi moraju biti od otpornog borosilikata, a preporučuje se upotreba opreme namijenjene isključivo određivanju elemenata u tragovima.
- 4.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar koji ispunjava zahtjeve metode u pogledu osjetljivosti i točnosti u potrebnom području.

5. Postupak ⁽¹⁾**5.1. Uzorci koji sadržavaju organske tvari****5.1.1. Spaljivanje i priprema otopine za analizu ⁽²⁾**

- 5.1.1.1. Odvagne se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,2 mg i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine (vidjeti napomenu pod točkom (b)), osuši u sušioniku na 105 °C i postavi u hladnu mufolnu peć (točka 4.1.). Peć se zatvori (vidjeti napomenu pod točkom (c)), a temperatura se tijekom 90 minuta postupno digne na 450 – 475 °C. Ta se temperatura zadrži od 4 do 16 sati (npr. preko noći) kako bi se uklonio karbonatni materijal, zatim se peć otvori i ohladi (vidjeti napomenu pod točkom (d)).

Pepeo se navlaži vodom i prenese u čašu volumena 250 ml. Lončić se ispere s ukupno približno 5 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.) i kiselina polako i oprezno prenese u čašu (može doći do burne reakcije zbog tvorbe CO₂). Klorovodična kiselina se dodaje u kapljicama (točka 3.1.) uz stalno miješanje dok ne prestane pjenjenje. Otpari se do suhog, uz povremeno miješanje staklenim štapićem.

Zatim se u ostatak doda 15 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i približno 120 ml vode. Promiješa se staklenim štapićem, koji se ostavi u čaši, a čaša se pokrije satnim staklom. Polako se zagrijava do ključanja i ostavi ključati do potpunog otapanja pepela. Filtrira se kroz filterni papir slobodan od pepela i filtrat prikupi u odmjernu tikvicu volumena 250 ml. Čaša i filter se isperu s 5 ml vruće klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i dvaput vrelom vodom. Odmjerna se tikvica dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Ako ostatak na filtru izgleda crn (ugljik), ponovo se stavi u peć i spali na 450 – 475 °C. To spaljivanje, koje zahtijeva samo nekoliko sati (približno tri do pet sati), završeno je kada pepeo postane bijel ili

⁽¹⁾ Mogu se koristiti i druge metode razgradnje ako dokazano daju slične rezultate (npr. mikrovalna razgradnja pod tlakom).

⁽²⁾ U zelenoj se krmi (svježoj ili osušenoj) mogu naći velike količine kvarca biljnog podrijetla, koji može sadržavati elemente u tragovima i mora biti uklonjen. Kod uzoraka takve hrane za životinje treba provesti sljedeći izmijenjeni postupak. Provodi se postupak iz točke 5.1.1.1. sve do filtracije. Filterni papir koji sadržava netopljivi ostatak dvaput se ispere vrelom vodom i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine. Spali se u mufolnoj peći (točka 4.1.) na temperaturi nižoj od 550 °C do potpunog nestanka svih karbonatnih tvari. Ostavi se da se ohladi, doda se nekoliko kapi vode i 10 – 15 ml fluorovodične kiseline (točka 3.4.), zatim se otpari do suhog na otprilike 150 °C. Ako se u ostatku i dalje nalazi kvarc, ponovno se otopi u nekoliko mililitara fluorovodične kiseline (točka 3.4.) i otpari do suhog. Doda se pet kapi sumporne kiseline (točka 3.5.) i grije dok ne prestane izlaziti bijeli dim. Nakon dodavanja 5 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.) i oko 30 ml vode, zagrije se i otopina filtrira u odmjernu tikvicu volumena 250 ml te dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl oko 0,5 mol/l). Nastavi se s utvrđivanjem u skladu s točkom 5.1.2.

▼ M9

gotovo bijel. Ostatak se otopi s približno 2 ml klorovodične kiseline (točka 3.1.), otpari se do suhog i doda 5 ml klorovodične kiseline 6 mol/l (točka 3.2.). Zagrije se, otopina se filtrira u odmjernu tikvicu i dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

Napomene:

- (a) Pri određivanju elemenata u tragovima važno je biti na oprezu zbog opasnosti od onečišćenja, posebno cinkom, bakrom i željezom. Zbog toga oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ne smije sadržavati navedene metale.

Kako bi se smanjio opći rizik od onečišćenja treba raditi u atmosferi bez prašine s potpuno čistom opremom i temeljito opranim staklenim posuđem. Određivanje cinka osobito je osjetljivo na više vrsta onečišćenja, npr. staklenim posuđem, reagensima, prašinom itd.

- (b) Masa uzorka koji se spaljuje izračunava se iz približnog udjela elementa u tragovima u hrani za životinje s obzirom na osjetljivost korištenog spektrofotometra. Kod nekih vrsta hrane za životinje s niskim udjelom elemenata u tragovima trebat će možda započeti s 10 – 20 g uzorka i konačnu otopinu dopuniti do samo 100 ml.

- (c) Spaljivanje se mora izvršiti u zatvorenoj peći bez upuhivanja zraka ili kisika.

- (d) Temperatura na pirometru ne smije prijeći 475 °C.

5.1.2. Određivanje spektrofotometrijom

5.1.2.1. Priprema kalibracijskih otopina

Za svaki element koji se određuje pripremi se serija kalibracijskih otopina iz radnih standardnih otopina iz točaka 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. i 3.10.1., pri čemu svaka kalibracijska otopina ima koncentraciju HCl od približno 0,5 mol/l i (u slučaju željeza, mangana i cinka) koncentraciju lantanovog klorida koja odgovara 0,1 % La (w/v).

Odabrane koncentracije elemenata u tragovima moraju biti unutar područja osjetljivosti korištenog spektrofotometra. U tablicama u nastavku kao primjer se navode tipična područja za kalibracijske otopine; međutim, ovisno o vrsti i osjetljivosti korištenog spektrofotometra možda će trebati odabrati drukčije koncentracije.

Željezo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml radne standardne otopine (točka 3.7.1.) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml

▼ **M9****Bakar**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radne standardne otopine (točka 3.8.1.) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 3.2.)	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radne standardne otopine (točka 3.9.1.) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml

Cink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml radne standardne otopine (točka 3.10.1.) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (točka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml

5.1.2.2. Priprema otopine za analizu

Za određivanje bakra, otopina pripravljena u skladu s točkom 5.1.1. obično se može koristiti izravno. Ako je potrebno koncentraciju prilagoditi području kalibracijskih otopina, alikvotni dio se može pipetom prenijeti u odmjernu tikvicu volumena 100 ml i dopuniti do oznake klorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (točka 3.3.).

Za određivanje željeza, mangana i cinka, pipetom se u odmjernu tikvicu volumena 100 ml prenese alikvotni dio otopine pripravljene u skladu s točkom 5.1.1., doda 10 ml otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) i dopuni do oznake klorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (točka 3.3.) (vidjeti i točku 8. „Napomena”).

5.1.2.3. Slijepa proba

Slijepa proba mora obuhvaćati sve propisane korake postupka, osim što se izostavlja uzorak. Kao otopina za slijepu probu ne smije se koristiti kalibracijska otopina „0”.

5.1.2.4. Mjerenje atomske apsorpcije

Oksidacijskim plamenom zrak-acetilen izmjeri se atomska apsorpcija kalibracijskih otopina i otopine koja se analizira, na sljedećim valnim duljinama:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Svako se mjerenje izvodi četiri puta.

▼ M9**5.2. Mineralna mješavina**

Ako uzorak ne sadržava organske tvari, nije potrebno prethodno spaljivanje. Nastavlja se kako je opisano u točki 5.1.1.1. počevši od drugog odlomka. Može se izostaviti otparivanje u prisutnosti fluorovodične kiseline.

6. Izračun rezultata

Koncentracija elementa u tragovima u otopini koja se analizira izračuna se iz kalibracijske krivulje, a rezultat se iskazuje u miligramima elementa u tragovima na kilogram uzorka (ppm).

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja koja na istom uzorku provodi isti analitičar ne smije prelaziti:

- 5 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio elementa u tragovima do 50 mg/kg,
- 10 % višeg rezultata za udio elementa u tragovima od 50 – 100 mg/kg,
- 10 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio elementa u tragovima od 100 – 200 mg/kg,
- 5 % višeg rezultata za udio elementa u tragovima iznad 200 mg/kg.

8. Napomena

Prisutnost velike količine fosfata može ometati postupak određivanja željeza, mangana i cinka. Takve se smetnje moraju korigirati dodavanjem otopine lantanovog klorida (točka 3.11.). Međutim, ako je maseni omjer u uzorku $(Ca + Mg/P) > 2$, može se izostaviti dodavanje otopine lantanovog klorida (točka 3.11.) u otopinu za analizu i kalibracijske otopine.

D. ODREĐIVANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid

Udio halofuginona određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (HPLC) uz upotrebu UV detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku.

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje razine halofuginona u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. Načelo

Nakon obrade vrućom vodom halofuginon se ekstrahira u obliku slobodne baze u etil acetatu, zatim razdvoji kao hidroklorid u vodenoj otopini kiseline. Ekstrakt se pročisti ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Udio halofuginona određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

▼ M9**3. Reagensi**

3.1. Acetonitril, za HPLC

3.2. Smola Amberlite XAD-2

3.3. Amonijev acetat

3.4. Etil acetat

3.5. Ledena octena kiselina

3.6. Standardna tvar halofuginon (DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni] kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid, E 764)

3.6.1. Temeljna standardna otopina halofuginona, 100 µg/ml

Odvagne se 50 mg halofuginona (točka 3.6.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 500 ml, otopi u puferskoj otopini amonijevog acetata (točka 3.18.), dopuni puferskom otopinom do oznake i promiješa. Ta je otopina stabilna tri tjedna na 5 °C ako se pohrani u tamnom prostoru.

3.6.2. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 100 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.6.1.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.21.) i promiješa. U ovim otopinama koncentracija halofuginona iznosi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.7. Klorovodična kiselina (ρ_{20} približno 1,16 g/ml)

3.8. Metanol

3.9. Srebrni nitrat

3.10. Natrijev askorbat

3.11. Natrijev karbonat

3.12. Natrijev klorid

3.13. EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol).

3.14. Voda, za HPLC

3.15. Otopina natrijevog karbonata, $c = 10$ g/100 ml3.16. Otopina natrijevog karbonata zasićena natrijevim kloridom, $c = 5$ g/100 ml

U vodi se otopi 50 g natrijevog karbonata (točka 3.11.), razrijedi do 1 litre, zatim se dodaje natrijev klorid (točka 3.12.) do zasićenja otopine.

3.17. Klorovodična kiselina, približno 0,1 mol/l.

Vodom se razrijedi 10 ml HCl (točka 3.7.) do 1 litre.

3.18. Puferska otopina amonijevog acetata, približno 0,25 mol/l

U vodi (točka 3.14.) se otopi 19,3 g amonijevog acetata (točka 3.3.) i 30 ml octene kiseline (točka 3.5.) i razrijedi do 1 litre.

▼ M9

3.19. Priprema smole Amberlite XAD-2

Vodom se ispere primjerena količina Amberlita (točka 3.2.) dok se ne uklone svi kloridni ioni, što se pokazuje pokusom sa srebrnim nitratom (točka 3.20.) u uklonjenoj vodenoj fazi. Zatim se smola ispere s 50 ml metanola (točka 3.8.), metanol ukloni, a smola pohrani u svježem metanolu.

3.20. Otopina srebrnog nitrata, približno 0,1 mol/l

Otopi se 0,17 g srebrnog nitrata (točka 3.9.) u 10 ml vode.

3.21. Mobilna faza za HPLC

Pomiješa se 500 ml acetonitrila (točka 3.1.) s 300 ml puferne otopine amonijevog acetata (točka 3.18.) i 1 200 ml vode (točka 3.14.). Octenom kiselinom (točka 3.5.) se vrijednost pH podesi na 4,3. Filtrira se kroz filtar 0,22 µm (točka 4.8.), otopina se zatim otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji). Ova je otopina stabilna mjesec dana ako se drži u zatvorenoj posudi u tamnom prostoru.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučna kupelj

4.2. Tankoslojni rotacijski otparivač

4.3. Centrifuga

4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda.

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 300 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica 10 µm, ili jednakovrijedna kolona

4.5. Staklena kolona (300 mm x 10 mm) s filtrom od sinteriranog stakla i pipcem

4.6. Filtri od staklenih vlakana, promjera 150 mm

4.7. Membranski filtri, 0,45 µm

4.8. Membranski filtri, 0,22 µm

5. Postupak

Napomena Halofuginon kao slobodna baza je nestabilan u bazičnim i etil-acetatnim otopinama. Ne smije se ostaviti u etil acetatu dulje od 30 minuta.

5.1. *Općenito*

5.1.1. Analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nije prisutan ni halofuginon ni interferirajuće tvari.

5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine halofuginona slične onoj koja se nalazi u uzorku. Za dobivanje koncentracije 3 mg/kg doda se 300 µl temeljne standardne otopine (točka 3.6.1.) u 10 g slijepa probe hrane za životinje, promiješa i prička 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (točka 5.2.).

Napomena: Za provedbu ove metode, slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost halofuginona.

▼ **M9**5.2. *Ekstrakcija*

Odvagne se 10 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 0,1 g i prenese u epruvetu za centrifugiranje volumena 200 ml, doda se 0,5 g natrijevog askorbata (točka 3.10.), 0,5 g EDTA (točka 3.13.) i 20 ml vode i promiješa. Epruveta se pet minuta drži u vodenoj kupelji (80 °C). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se 20 ml otopine natrijevog karbonata (točka 3.15.) i promiješa. Odmah se doda 100 ml etil acetata (točka 3.4.) i 15 sekunda snažno trese rukom. Zatim se epruveta tri minute drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) i olabavi slavina. Centrifugira se dvije minute, faza etil acetata se dekantira kroz filter od staklenih vlakana (točka 4.6.) u lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml. Ponovi se ekstrakcija uzorka s dodatnih 100 ml etilacetata. Pomiješani se ekstrakti ispiru jednu minutu s 50 ml otopine natrijevog karbonata zasićene natrijevim kloridom (točka 3.16.), a vodeni se sloj odbaci.

Organski se sloj ekstrahira jednu minutu s 50 ml klorovodične kiseline (točka 3.17.). Donji se kiselinski sloj prenese u lijevak za odjeljivanje volumena 250 ml. Organski se sloj ponovo ekstrahira 1,5 minuta s dodatnih 50 ml klorovodične kiseline i pomiješa s prvim ekstraktom. Pomiješani se kiselinski ekstrakti približno 10 sekunda ispiru protresivanjem s 10 ml etil acetata (točka 3.4.).

Vodeni se sloj kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml, a organska faza se odbaci. Iz kisele se otopine u rotacijskom otparivaču (točka 4.2.) otpari sav preostali etil acetat. Temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Pod vakuumom na približno 25 mbar odstrani se sav preostali etil acetat u pet minuta na 38 °C.

5.3. *Pročišćivanje*5.3.1. *Priprema kolone s Amberlitom*

Kolona XAD-2 se pripremi za svaki ekstrakt uzorka. Metanolom (točka 3.8.) se prenese 10 g pripravljenog Amberlita (točka 3.19.) u staklenu kolonu (točka 4.5.). Na vrh posteljice od smole postavi se tampon od staklene vune. Metanol se ispusti iz kolone, a smola ispere sa 100 ml vode tako da se dotok vode zaustavi kada tekućina dosegne vrh posteljice od smole. Prije uporabe kolona se ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežila. Kolona se nikad ne smije isušiti.

5.3.2. *Pročišćavanje uzorka*

Ekstrakt (točka 5.2.) se kvantitativno prenese na vrh pripremljene kolone s Amberlitom (točka 5.3.1.) i eluira, a eluat se odbaci. Brzina eluiranja ne smije biti veća od 20 ml/min. Tikvica s okruglim dnom se ispere s 20 ml klorovodične kiseline (točka 3.17.) i sadržaj iskoristi za ispiranje kolone sa smolom. Preostala se kiselinska otopina ukloni propuhivanjem zraka. Odbaci se tekućina od ispiranja. U kolonu se doda 100 ml metanola (točka 3.8.), 5 – 10 ml se eluira, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml. Preostali se metanol ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežio sa smolom i nastavi se eluiranje brzinom koja ne prelazi 20 ml/min, a eluat se prikuplja u istoj tikvici s okruglim dnom. Metanol se otpari na rotacijskom otparivaču (točka 4.2.), pri čemu temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Ostatak se s mobilnom fazom (točka 3.21.) kvantitativno prenese u građiranu tikvicu volumena 10 ml. Dopuni se do oznake mobilnom fazom i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (točka 4.7.). Ta se otopina pohrani za HPLC određivanje (točka 5.4.).

▼ M9**5.4. HPLC određivanje****5.4.1. Parametri**

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.)

Mobilna faza za HPLC (točka 3.21.)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Valna duljina detekcije: 243 nm

Volumen za injektiranje: 40 – 100 µl.

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.6.2.) koncentracije 3,0 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Svaka se kalibracijska otopina (točka 3.6.2.) injektira više puta i za svaku se koncentraciju odrede vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.3.2.), pri čemu se koristi jednaki volumen kao za kalibracijske otopine, a zatim se odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova halofuginona.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova halofuginona otopine uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2.).

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

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

pri čemu je:

c = : koncentracija halofuginona u otopini uzorka u µg/ml,

m = : masa testnog dijela u gramima.

7. Validacija rezultata**7.1 Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda s pomoću kojih se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.6.2.) koncentracije 6,0 µg/ml.

7.1.1 Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.6.2.). Količina dodanog halofuginona mora biti slična procijenjenoj količini halofuginona u ekstraktu uzorka.

▼ M9

Dopušteno je povećanje samo visine pika halofuginona uzimajući u obzir dodanu količinu i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici maksimalne visine mora biti unutar ± 10 % početne širine.

7.1.2 Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;
- (b) između 225 i 300 nm spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanције. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanције standardnog analita;
- (c) između 225 i 300 nm spektri uzlaznog dijela, vrha i silaznog dijela krivulje ekstrakta uzorka ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbanције. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između spektara ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbanције spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 0,5 mg/kg za udio halofuginona do 3 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija ⁽¹⁾ u kojoj su u osam laboratorija analizirana tri uzorka.

Rezultati

	Uzorak A (slijepi) Kod prijama	Uzorak B (brašno)		Uzorak C (pelete)	
		Kod prijama	Nakon dva mjeseca	Kod prijama	Nakon dva mjeseca
Srednja vrijednost [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983., str. 1252–1256.

▼ **M9**

	Uzorak A (slijepi) Kod prijama	Uzorak B (brašno)		Uzorak C (pelete)	
		Kod prijama	Nakon dva mjeseca	Kod prijama	Nakon dva mjeseca
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = nije određeno

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Rec. = iskorištenje (%)

E. ODREĐIVANJE ROBENIDINA

1,3-bis [(4-klorbenziliden)amino]gvanidin – hidroklorid

Udio robenidina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (HPLC) uz upotrebu UV detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku.

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje razine robenidina u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Ekstrakt se osuši i alikvotni dio pročisti na koloni s aluminijevim oksidom. Robenidin se eluira metanolom iz kolone, koncentrira i dopuni mobilnom fazom do prikladnog volumena. Udio robenidina određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Zakiseljeni metanol

U građuiranu tikvicu volumena 500 ml prenese se 4,0 ml klorovodične kiseline (p20 = 1,18 g/ml), dopuni metanolom (točka 3.1.) do oznake i promiješa. Ova se otopina priprema svježa prije uporabe.

3.3. Acetonitril, za HPLC

3.4. Molekularno sito

Tip 3 A, očiće mreže od 8 do 12 (očiće promjera 1,6 – 2,5 mm, kristalni aluminijev silikat, promjer pora 0,3 mm).

3.5. Aluminijev oksid kiselinske aktivnosti I. stupnja, za kolonsku kromatografiju

▼M9

U prikladnu se posudu prenese 100 g aluminijevog oksida i doda 2,0 ml vode. Začepi se i trese približno 20 minuta. Drži se u čvrsto zatvorenoj posudi.

3.6. Otopina kalijevog dihidrogenfosfata, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

U vodi se otopi 3,40 g kalijevog dihidrogenfosfata (za HPLC) u graduiranoj tikvici volumena 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.7. Otopina dinatrijevog hidrogenfosfata, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

U vodi se otopi 3,55 g bezvodnog dinatrijevog hidrogenfosfata (ili 4,45 g dihidrata ili 8,95 g dodekahidrata) (za HPLC) u graduiranoj tikvici volumena 1 l, dopuni do oznake i promiješa.

3.8. Mobilna faza za HPLC

Pomiješaju se sljedeći reagensi:

650 ml acetonitrila (točka 3.3.),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml otopine kalijevog dihidrogenfosfata (točka 3.6.),

50 ml otopine dinatrijevog hidrogenfosfata (točka 3.7.).

Filtrira se kroz filtar $0,22 \mu\text{m}$ (točka 4.6.), otopina se zatim otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

3.9. Standardna tvar

Čisti robenidin: 1,3-bis [(4-klorbenziliden)amino]gvanidin-hidroklorid

3.9.1. Temeljna standardna otopina robenidina: $300 \mu\text{g/ml}$

Odvagne se 30 mg standardnog robenidina (točka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg. Otopi se u zakiseljenom metanolu (točka 3.2.) u graduiranoj tikvici volumena 100 ml, dopuni istim otapalom do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na tamno mjesto.

3.9.2. Intermedijarna standardna otopina robenidina: $12 \mu\text{g/ml}$

U graduiranu tikvicu volumena 250 ml prenese se 10,0 ml temeljne standardne otopine robenidina (točka 3.9.1.), dopuni mobilnom fazom (točka 3.8.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na tamno mjesto.

3.9.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 50 ml prenese se 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.9.2.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.8.) i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentracijama robenidina od 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 i $6,0 \mu\text{g/ml}$. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.10. Voda za HPLC

4. Oprema

4.1. Staklena kolona.

Od smeđeg stakla, s pipcem i spremnikom volumena približno 150 ml, unutarnjeg promjera 10 – 15 mm, dužine 250 mm

▼ M9

- 4.2. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica
- 4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač
- 4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda s radnim područjem od 250 – 400 nm.
 - 4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica 10 µm, ili ekvivalentna
- 4.5. Filtarski papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentan).
- 4.6. Membranski filtri, 0,22 µm
- 4.7. Membranski filtri, 0,45 µm

5. Postupak

Napomena: Robenidin je osjetljiv na svjetlo. U svim se postupcima mora koristiti posuđe od smeđeg stakla.

- 5.1. *Općenito*
 - 5.1.1. Analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nije prisutan ni robenidin ni interferirajuće tvari.
 - 5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepa probe hrane za životinje (točka 5.1.1.) koja se obogati dodavanjem količine robenidina slične onoj koja je nalazi u uzorku. Za dobivanje koncentracije 60 mg/kg prenese se 3,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.9.1.) u konusnu tikvicu volumena 250 ml. Otopina se otpari u struji dušika do približno 0,5 ml. Doda se 15 g slijepa probe hrane za životinje, promiješa i ostavi 10 minuta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

Napomena: Za provedbu ove metode, slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost robenidina.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 15 g pripremljenog uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu volumena 250 ml, doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.2.), začepi i trese jedan sat u tresilici (točka 4.2.). Otopina se filtrira kroz filtarski papir od staklenih vlakana (točka 4.5.) u konusnu tikvicu obujma 150 ml. Doda se 7,5 g molekularnog sita (točka 3.4.), začepi i trese pet minuta. Odmah se filtrira kroz filtarski papir od staklenih vlakana. Otopina se pohrani za fazu pročišćavanja (točka 5.3.).

5.3. Pročišćavanje**5.3.1. Priprema kolone s aluminijevim oksidom**

U donji dio staklene kolone (točka 4.1.) postavi se mali čep od staklene vune i potisne staklenim štapićem. Odvagne se 11,0 g pripremljenog aluminijevog oksida (točka 3.5.) i prenese u kolonu. Izloženost zraku tijekom navedenog postupka treba pritom biti što manja. Laganim udarcima po donjem dijelu napunjene kolone istaloži se aluminijev oksid.

▼ M9**5.3.2. Pročišćavanje uzorka**

U kolonu se pipetom prenese 5,0 ml pripravljenog ekstrakta uzorka (točka 5.2.). Vrh pipete se nasloni na stijenku kolone, zatim se pusti da aluminijev oksid apsorbira otopinu. Robenidin se eluira iz kolone sa 100 ml metanola (točka 3.1.) uz brzinu protoka od 2 – 3 ml/min, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml. Otopina metanola se otpari u rotacijskom otparivaču (točka 4.3.) do suhog pri sniženom tlaku na 40 °C. Ostatak se ponovo otopi u 3 – 4 ml mobilne faze (točka 3.8.) i kvantitativno prenese u građiranu tikvicu volumena 10 ml. Tikvica se nekoliko puta ispere količinom od 1 – 2 ml mobilne faze, a isprana tekućina prenese u građiranu tikvicu. Dopuni se istim otapalom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.7.). Otopina se pohrani za HPLC određivanje (točka 5.4.).

5.4. HPLC određivanje**5.4.1. Parametri**

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1.),

Mobilna faza za HPLC (točka 3.8.),

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min,

Valna duljina detekcije: 317 nm,

Volumen za injektiranje: 20 do 50 µl.

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.9.3.) koncentracije 3,6 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Svaka se kalibracijska otopina (točka 3.9.3.) injektira više puta i za svaku koncentraciju odrede vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.3.2.), pri čemu se koristi jednaki volumen kao za kalibracijske otopine, a zatim se odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova robenidina.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova robenidina otopine uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2.).

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

▼ M9

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

pri čemu je:

c = koncentracija robenidina u otopini uzorka u $\mu\text{g/ml}$,

m = masa testnog dijela u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojima se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.9.3.) koncentracije 6 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.9.3.). Količina dodanog robenidina mora biti slična procijenjenoj količini robenidina u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika robenidina uzimajući u obzir dodanu količinu i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici maksimalne visine mora biti unutar približno 10 % početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar približno 2 nm;
- (b) između 250 i 400 nm spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita;
- (c) između 250 i 400 nm spektri uzlaznog dijela, vrha i silaznog dijela krivulje ekstrakta uzorka ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između spektara ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti 10 % vrijednosti višeg rezultata za udio robenidina veći od 15 mg/kg.

▼ **M9**7.3. *Iskorištenje*

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 85 %.

8. **Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija na razini EU-a u kojoj su u 12 laboratorija analizirana četiri uzorka hrane za perad i kuniće u obliku brašna ili peleta. Svaki je uzorak analiziran dvaput. Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Hrana za perad		Hrana za kuniće	
	Brašno	Pelete	Brašno	Pelete
Srednja vrijednost [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Iskorištenje [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

F. ODREĐIVANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitril

Udio diklazurila određuje se:

— analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili

— tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom i ternarnim gradijentom (HPLC) uz upotrebu UV detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 9. u nastavku.

1. **Svrha i područje primjene**

Ova metoda omogućuje određivanje razine diklazurila u krmnim smjesama i premiksima⁽¹⁾. Granica detekcije iznosi 0,1 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,5 mg/kg. Moguće je postići niže granice kvantifikacije, ali to mora validirati korisnik.

2. **Načelo**

Nakon dodavanja internog standarda, uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Kod hrane za životinje alikvot ekstrakta se pročisti na C18 ekstrakcijskoj koloni u krutoj fazi. Diklazuril se eluira s ekstrakcijske kolone smjesom zakiseljenog metanola i vode. Nakon otparivanja,

⁽¹⁾ Ta se metoda može koristiti i za određivanje diklazurila u krmivima.

▼ **M9**

ostatak se otopi u smjesi DMF/voda. Kod premiksa, ekstrakt se otpari, a ostatak otopi u smjesi DMF/voda. Udio diklazurila određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s reverznom fazom i ternarnim gradijentom uz upotrebu UV detektora.

3. **Reagensi**

3.1. Voda, za HPLC

3.2. Amonijev acetat

3.3. Tetrabutylamonijev hidrogen sulfat (TBHS)

3.4. Acetonitril, za HPLC

3.5. Metanol, za HPLC

3.6. N, N-dimetilformamid (DMF)

3.7. Klorovodična kiselina, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml

3.8. Standardna tvar: diklazuril: (+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril zajamčene čistoće

3.8.1. Temeljna standardna otopina diklazurila, 500 µg/ml

Odvagne se 25 mg standardne tvari diklazurila (točka 3.8.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 50 ml. Otopi se u DMF-u (točka 3.6.), dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi od 4 °C ili nižoj otopina je stabilna 1 mjesec ⁽¹⁾.

3.8.2. Standardna otopina diklazurila, 50 µg/ml

U građuiranu tikvicu volumena 50 ml prenese se 5,00 ml temeljne standardne otopine (točka 3.8.1.), dopuni do oznake DMF-om (točka 3.6.) i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi od 4 °C ili nižoj otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9. Interni standard: 2,6 diklor- α -(4-klorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H)- il) α -metilbenzen-acetonitril (metil diklazuril)

3.9.1. Temeljna standardna otopina, 500 µg/ml

Odvagne se 25 mg internog standarda (točka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 50 ml. Otopi se u DMF-u (točka 3.6.), dopuni DMF-om (točka 3.6.) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi od 4 °C ili nižoj otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.2. Otopina internog standarda, 50 µg/ml

U građuiranu tikvicu volumena 50 ml prenese se 5,00 ml temeljne otopine internog standarda (točka 3.9.1.), dopuni do oznake DMF-om (točka 3.6.) i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi od 4 °C ili nižoj otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.3. Otopina internog standarda za premikse, p/1 000 mg/ml (p = nominalni udio diklazurila u premiksu, u mg/kg)

Odvagne se p/10 mg internog standarda s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 100 ml, otopi u DMF-u (točka 3.6.) u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.7.), dopuni DMF-om do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi od 4 °C ili nižoj otopina je stabilna 1 mjesec.

⁽¹⁾ Može biti moguća i dulja stabilnost (do 1 godine), ali je mora potvrditi pojedinačni laboratorij.

▼ **M9**

3.10. Kalibracijske otopine

3.10.1. Kalibracijska otopina, 1 µg/ml (diklazuril)

Pipetom se prenese 1,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml. Doda se 17 ml DMF (točka 3.6.), dopuni se vodom do oznake (točka 3.1.) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.2. Kalibracijska otopina, 2 µg/ml (diklazuril)

Pipetom se prenese 2,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml. Doda se 16 ml DMF (točka 3.6.), dopuni se vodom do oznake (točka 3.1.) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.3. Kalibracijska otopina, 3 µg/ml (diklazuril)

Pipetom se prenese 3,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml. Doda se 15 ml DMF (točka 3.6.), dopuni se vodom do oznake (točka 3.1.) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.4. Kalibracijska otopina, 4 µg/ml (diklazuril)

Pipetom se prenese 4,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml. Doda se 14 ml DMF (točka 3.6.), dopuni se vodom do oznake (točka 3.1.) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.5. Kalibracijska otopina, 5 µg/ml (diklazuril)

Pipetom se prenese 5,00 ml standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2.) i 2,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) u graduiranu tikvicu volumena 50 ml. Doda se 13 ml DMF (točka 3.6.), dopuni se vodom do oznake (točka 3.1.) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

NAPOMENA:

Kalibracijske otopine (točke 3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) obuhvaćaju koncentracije diklazurila u hrani za životinje u rasponu od 0,5 do 2,5 mg/kg pri uporabi aktualnog protokola.

3.11. C₁₈ ekstrakcijska kolona u krutoj fazi, npr. Mega Bond Elut, veličina: 20 cc, masa sorbensa: 5 000 mg (pretkondicioniranje prema uputama dobavljača).

3.12. Ekstrakcijsko otapalo: zakiseljeni metanol

Pipetom se prenese 5,0 ml klorovodične kiseline (točka 3.7.) u 1 000 ml metanola (točka 3.5.) i promiješa.

3.13. Mobilna faza za HPLC

3.13.1. Eluent A: otopina amonijevog acetata i tetrabutilamonijevog hidrogen sulfata.

Otopi se 5 g amonijevog acetata (točka 3.2.) i 3,4 g TBHS-a (točka 3.3.) u 1 000 ml vode (točka 3.1.) i promiješa.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (točka 3.4.).

3.13.3. Eluent C: metanol (točka 3.5.).

▼ M9**4. Oprema**

- 4.1. Mehanička tresilica
- 4.2. Oprema za HPLC s ternarnim gradijentom
 - 4.2.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, Hypersil ODS, veličina čestica 3 μm , 100 mm x 4,6 mm, ili ekvivalentna
 - 4.2.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda
- 4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač
- 4.4. Membranski filter (npr. kemijski otporni najlon), 0,45 μm
- 4.5. Štrcaljka za jednokratnu upotrebu, 5 ml
- 4.6. Vakuumski ventil
- 4.7. Ultrazvučna kupelj

5. Postupak**5.1. Općenito****5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje**

Analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nije prisutan ni diklauril ni interferirajuće tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost diklaurila ili interferirajućih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine diklaurila slične onoj koja se nalazi u uzorku. Za dobivanje koncentracije 1 mg/kg doda se 0,1 ml temeljne standardne otopine (točka 3.8.1.) u 50 g slijepa probe hrane za životinje, temeljito promiješa i ostavi 10 minuta, a prije nastavka (točka 5.2.) se miješanje više puta ponovi.

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se provesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati količinom diklaurila sličnom onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija**5.2.1. Krmna smjesa**

Odvagne se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu volumena 500 ml, doda se 1,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.2.) i 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smjesa se tijekom noći protresa u tresilici (točka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U odgovarajuću staklenu posudu prenese se alikvot od 20 ml supernatanta i razrijedi s 20 ml vode (točka 3.1.). Ova se otopina prenese u ekstrakcijsku kolonu (točka 3.11.) i filtrira pod vakuumom (točka 4.6.). Ekstrakcijska kolona se ispere s 25 ml smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.) i vode (točka 3.1.), 65 + 35 (V + V). Prikupljene se frakcije odbace, a spojevi eluiraju s 25 ml smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.) i vode, 80 + 20 (V + V). Ova se frakcija otpara u rotacijskom otparivaču (točka 4.3.) pri 60 °C dok se ne počne sušiti. Ostatok se otopi u 1,0 ml DMF-a (točka 3.6.), doda se 1,5 ml vode (točka 3.1.) i promiješa. Filtrira se kroz membranski filter (točka 4.4.) postavljen na štrcaljku za jednokratnu upotrebu (točka 4.5.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

▼ **M9**

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g. Prenese se u konusnu tikvicu volumena 500 ml, doda se 1,00 ml otopine internog standarda (točka 3.9.3.) i 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smjesa se tijekom noći protresa u tresilici (točka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U primjereno veliku tikvicu s okruglim dnom prenese se alikvot od 10 000/p ml (p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksi) supernatanta. Otparava se pod sniženim tlakom na 60 °C u rotacijskom otparivaču (točka 4.3.) dok se ne počne sušiti. Ostatak se ponovno otopi u 10,0 ml DMF-a (točka 3.6.), doda se 15,0 ml vode (točka 3.1.) i promiješa. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri

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

— Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.2.1.): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, veličina čestica 3 μm, ili ekvivalentna.

— Mobilna faza

— Eluent A (točka 3.13.1.): vodena otopina amonijevog acetata i tetrabutil amonijevog hidrogen sulfata.

— Eluent B (točka 3.13.2.): acetonitril.

— Eluent C (točka 3.13.3.): metanol.

— Način eluiranja – linearni gradijent

— početni uvjeti: $A + B + C = 60 + 20 + 20$ (V + V + V),

— nakon 10 minuta, protok s gradijentom tijekom 30 minuta do:
 $A + B + C = 45 + 20 + 35$ (V + V + V),

— nakon toga ispiranje 10 minuta s B.

— Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

— Volumen za injektiranje: 20 μl

— Valna duljina detekcije: 280 nm

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.10.2.) koncentracije 2 μg/ml diklazurila i internog standarda, sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kromatografska analiza kalibracijskih otopina

Dvapat se injektira 20 μl svake od kalibracijskih otopina (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4. i 3.10.5.), odrede se i spoje pikovi diklazurila i internog standarda i pripremi kalibracijska krivulja na temelju omjera srednje vrijednosti visine ili površine pika diklazurila i srednje vrijednosti visine ili površine pika internog standarda u odnosu na koncentraciju diklazurila u kalibracijskim otopinama (μg/ml).

5.3.3. Kromatografska analiza otopina uzorka

Dvapat se injektira 20 μl otopine uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) i odredi srednja vrijednost visine ili površine pikova diklazurila i internog standarda.

▼ **M9****6. Izračun rezultata****6.1. Krmna smjesa**

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ili } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

pri čemu je:

- $Visina(d,s)$ je visina pika diklaurila u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
- $Površina(d,s)$ je površina pika diklaurila u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
- $Visina(i,s)$ je visina pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
- $Površina(i,s)$ je površina pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.1.)
- b je odsječak kalibracijske krivulje izrađene iz kalibracijskih otopina (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s točkom 5.3.2.
- a je nagib kalibracijske krivulje izrađene iz kalibracijskih otopina (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s točkom 5.3.2.
- m = masa testnog dijela u gramima
- V je konačni volumen u mililitrima ekstrakta uzorka nakon ponovnog otapanja u skladu s točkom 5.2.1. (tj. 2,5 ml)

6.2. Premiksi

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

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ ili } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

pri čemu je:

- $Visina(d,s)$ je visina pika diklaurila u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
- $Površina(d,s)$ je površina pika diklaurila u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
- $Visina(i,s)$ je visina pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
- $Površina(i,s)$ je površina pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.2.)
- b je odsječak kalibracijske krivulje izrađene iz kalibracijskih otopina (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s točkom 5.3.2.
- a je nagib kalibracijske krivulje izrađene iz kalibracijskih otopina (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s točkom 5.3.2.
- m = masa testnog dijela u gramima
- V je konačni volumen u mililitrima ekstrakta uzorka nakon ponovnog otapanja u skladu s točkom 5.2.2. (tj. 25 ml)
- p je nominalni udio diklaurila u mg/kg u premiksi

▼ M9**7. Validacija rezultata****7.1. Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.10.2).

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.10.2.). Količina dodanog diklazurila mora biti slična količini diklazurila u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika diklazurila i pika internog standarda uzimajući u obzir dodanu količinu i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici visine mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika diklazurila ili pika internog standarda u neobogaćenom ekstraktu uzorka.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.
- (b) između 230 i 320 nm spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.
- (c) između 230 i 320 nm spektri uzlaznog dijela, vrha i silaznog dijela krivulje ekstrakta uzorka ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između spektara ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše točke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva neovisna mjerenja provedena na dva poduzorka ne smije prelaziti:

— 30 % više vrijednosti za udio diklazurila od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg za udio diklazurila od 2,5 mg/kg do 5 mg/kg,

— 15 % više vrijednosti za udio diklazurila veći od 5 mg/kg.

▼ M9

7.3 *Iskorištenje*

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 80 %.

8. **Rezultati međulaboratorijske studije**

Organizirane su dvije međulaboratorijske studije. U prvoj, koju je provela druga skupina laboratorija 1994., analizirani uzorci bili su dva premiksa (O 100, A 100) i tri uzorka dopunske krmne smjese za perad (L1, Z1, K1). Jedan uzorak premiksa je bio pomiješan s organskom matricom (O 100), a drugi s anorganskom matricom (A 100). Teoretski udio iznosi 100 mg diklazurila na kg. Od laboratorija je zatraženo da svaki uzorak analiziraju jedanput ili dvaput. (Detaljnije informacije o prvoj međulaboratorijskoj studiji mogu se pronaći u *Journal of AOAC International*, svezak 77, br. 6, 1994., str. 1359–1361).

U drugoj međulaboratorijskoj studiji analizirane su tri krmne smjese za perad koje sadržavaju diklazuril u koncentracijama 0,9 mg/kg (MAT 1) i 1,5 mg/kg (MAT 2) i slijepa proba hrane za životinje (MAT 3). Detaljne informacije o drugoj studiji mogu se pronaći u Tehničkom izvješću JRC-a (2016.) i u *Journal of AOAC International*, svezak 102, br. 2, 2019., str. 646–652. Rezultati dviju međulaboratorijskih studija navedeni su u sljedećoj tablici.

	Uzorak 1 A 100	Uzorak 2 O 100	Uzorak 3 L1	Uzorak 4 Z1	Uzorak 5 K1	Uzorak 6 MAT 1	Uzorak 7 MAT 2	Uzorak 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Srednja vrijednost (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Nominalni udio (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referenca (*)	Prva studija iz 1 994.	Prva studija iz 1 994.	Prva studija iz 1 994.	Prva studija iz 1 994.	Prva studija iz 1 994.	Druga studija iz 2 015.	Druga studija iz 2 015.	Druga studija iz 2 015.

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

S_r = standardna devijacija ponovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti

S_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti

LOQ = granica kvantifikacije

(*) Prva studija iz 1994.: *Journal of AOAC International*, svezak 77, br. 6, 1994., str. 1359–1361.; Druga studija iz 2015.: tehničko izvješće JRC-a Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study (2016.).

▼ **M9****9. Opće napomene**

Prethodno treba dokazati da je odziv diklaurila linearan u području koncentracija koje se mjere.

Barem za analizu diklaurila u krmnim smjesama s visokim udjelom masti (u ovu svrhu s udjelom masti većim od 12 %) analitička metoda može se zamijeniti drugim metodama koje se temelje na HPLC-u, npr. metodom temeljenom na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti spregnutoj s masenom spektrometrijom (HPLC-MS), pod uvjetom da zamjenska metoda ima jednaka svojstva učinkovitosti (stupanj iskorštenja, preciznost pri uvjetima ponovljivosti i obnovljivosti).

G. ODREĐIVANJE LASALOCID NATRIJA

Natrijeva sol polierter monokarboksilne kiseline koju proizvodi Streptomyces lasaliensis

Udio lasalocid natrija određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (HPLC) uz upotrebu spektrofotometrijskog (fluorescencijskog) detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku.

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje razine lasalocid natrija u hrani za životinje. Granica detekcije iznosi 5 mg/kg, a granica kvantifikacije 10 mg/kg.

2. Načelo

Lasalocid natrij se ekstrahira iz uzorka u zakiseljeni metanol i određuje tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu spektrofotometrijskog (fluorescencijskog) detektora.

3. Reagensi

3.1. Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)

3.2. Ortofosforna kiselina, w (w/w) = 85 %

3.3. Otopina ortofosforne kiseline, c = 20 %.

Razrijedi se 23,5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.2.) s vodom do 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), w (w/w) = 99 %

3.5. Metanol, za HPLC

3.6. Klorovodična kiselina, gustoća = 1,19 g/ml.

3.7. Otopina fosfatnog pufera, c = 0,01 mol/l.

Otopi se 1,36 g KH_2PO_4 (točka 3.1.) u 500 ml vode (točka 3.11.), doda se 3,5 ml ortofosforne kiseline (točka 3.2.) i 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (točka 3.4.). Otopinom ortofosforne kiseline (točka 3.3.) pH-vrijednost se podesi na 4,0 i razrijedi vodom (točka 3.11.) do 1 000 ml.

▼ M9**3.8. Zakiseljeni metanol**

U graduiranu tikvicu volumena 1 000 ml prenese se 5,0 ml klorovodične kiseline (točka 3.6.), dopuni metanolom (točka 3.5.) do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.9. Mobilna faza za HPLC, otopina fosfatnog pufera i metanola 5 + 95 (V + V).

Pomiješa se 5 ml otopine fosfatnog pufera (točka 3.7.) s 95 ml metanola (točka 3.5.).

3.10. Lasalocid natrij standardna tvar, zajamčene čistoće, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (natrijeva sol polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*), E763.**3.10.1. Temeljna standardna otopina lasalocid natrija, 500 µg/ml**

Odvagne se 50 mg lasalocid natrija (točka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 ml, otopi u zakiseljenom metanolu (točka 3.8.) i istim otapalom dopuni do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.2. Intermedijarna standardna otopina lasalocid natrija, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 10,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.10.1.) u graduiranu tikvicu volumena 100 ml, dopuni zakiseljenim metanolom (točka 3.8.) do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.10.2.). Zakiseljenim se metanolom dopuni do oznake (točka 3.8.) i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentracijama lasalocid natrija od 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 µg/ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.11. Voda, za HPLC**4. Oprema****4.1. Ultrazvučna kupelj (ili vodena kupelj s protresanjem) s kontrolom temperature****4.2. Membranski filtri, 0,45 µm****4.3. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje prikladnim za injektiranje volumena od 20 µl****4.3.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju 125 mm x 4 mm s reverznom fazom, C_{18} , veličina čestica 5 µm, ili ekvivalentna****4.3.2. Spektrofluorimetar s mogućnošću promjene valne duljine (ekscitacije i emisije)****5. Postupak****5.1. Općenito****5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje**

Za provedbu testa iskorištenja (točka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni ni lasalocid natrij ni interferirajuće tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost lasalocid natrija i interferirajućih tvari.

▼ **M9**

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine lasalocid natrija slične onoj koja se nalazi u uzorku. Za dobivanje koncentracije 100 mg/kg prenese se 10,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.10.1.) u konusnu tikvicu volumena 250 ml i otopina otpari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se provesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati količinom lasalocid natrija sličnom onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Hrana za životinje

Odvagne se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu volumena 250 ml s čepom. Pipetom se doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.8.). Poklopac se lagano zatvori i tikvica protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Ostavi se približno 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.2.) u prikladnu posudu. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 2 g neusitnjenog premiksa s preciznošću od 0,001 g i prenese u graduiranu tikvicu volumena 250 ml. Doda se 100,0 ml zakiseljenog metanola (točka 3.8.), tikvica se protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se sa sadržajem drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Zakiseljenim se metanolom (točka 3.8.) razrijedi do oznake i dobro promiješa. Ostavi se 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.2.). Prikladan volumen čistog filtrata razrijedi se zakiseljenim metanolom (točka 3.8.), čime se dobiva konačna testna otopina koncentracije približno 4 µg/ml lasalocid natrija. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. *HPLC određivanje*

5.3.1. Parametri

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju s C_{18} , veličina čestica 5 µm, ili ekvivalentna reverznom fazom (točka 4.3.1.),
125 mm x 4 mm:

Mobilna faza (točka 3.9.): Smjesa otopine fosfatnog pufera (točka 3.7.) i metanola (točka 3.5.), 5 + 95 (V + V)

Brzina protoka: 1,2 ml/min

Valne duljine detekcije: Ekscitacija: 310 nm

Emisija: 419 nm

Volumen za injektiranje: 20 µl

▼ M9

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 4,0 µg/ml (točka 3.10.3.) sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna vremena retencije.

5.3.2. **Kalibracijska krivulja**

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.10.3.) i za svaku koncentraciju odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. **Otopina uzorka**

Više puta se injektiraju ekstrakti uzorka dobiveni u točki 5.2.1. ili 5.2.2., pri čemu se koristi jednaki volumen kao za kalibracijsku otopinu, a zatim se odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova lasalocid natrija.

6. Izračun rezultata

Iz srednje se vrijednosti visine (površine) pikova dobivenih injektiranjem otopine uzorka (točka 5.3.3.) određuje koncentracija lasalocid natrija (µg/ml) iz kalibracijske krivulje.

6.1. *Hrana za životinje*

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.1.) u µg/ml;

V₁ = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.1. u ml (tj. 100);

m = masa testnog dijela u gramima.

6.2. *Premiksi*

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.2.) u µg/ml;

V₂ = volumen ekstrakta uzorka u skladu s točkom 5.2.2. u ml (tj. 250);

f = faktor razrjeđenja u skladu s 5.2.2.;

m = masa testnog dijela u gramima.

▼ M9**7. Validacija rezultata****7.1. Identifikacija**

Metode koje se temelje na spektrofotometriji manje su podložne interferencijama od metoda kod kojih se koristi UV detekcija. Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom.

7.1.1. Ko-kromatografija

Ekstrakt uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2.) obogati se primjerenom količinom kalibracijske otopine (točka 3.10.3.). Količina dodanog lasalocid natrija mora biti slična količini lasalocid natrija u ekstraktu uzorka. Dopusšteno je povećanje samo visine pika lasalocid natrija uzimajući u obzir količinu dodanog lasalocid natrija i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika, na polovici visine, mora biti unutar ± 10 % početne vrijednosti širine pika dobivene iz neobogaćenog ekstrakta uzorka.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

— 15 % više vrijednosti za udio lasalocid natrija od 30 – 100 mg/kg,

— 15 mg/kg za udio lasalocid natrija od 100 – 200 mg/kg,

— 7,5 % više vrijednosti za udio lasalocid natrija veći od 200 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80 %. Za obogaćene uzorke premiksa iskorištenje mora iznositi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Provedena je međulaboratorijska studija (*) u kojoj su u 12 laboratorija analizirana dva premiksa (uzorci 1 i 2) i pet uzoraka hrane za životinje (uzorci 3–7). Svaki je uzorak analiziran dvaput. Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Uzorak 1 Premiks za piliće	Uzorak 2 Premiks za purane	Uzorak 3 Pelete za purane	Uzorak 4 Mrvljeni peleti za kokoši	Uzorak 5 Hrana za purane	Uzorak 6 Hrana za perad A	Uzorak 7 Hrana za perad B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrijed- nost [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

▼ **M9**

	Uzorak 1 Premiks za piliće	Uzorak 2 Premiks za purane	Uzorak 3 Pelete za purane	Uzorak 4 Mrvljeni peleti za kokoši	Uzorak 5 Hrana za purane	Uzorak 6 Hrana za perad A	Uzorak 7 Hrana za perad B
Nominalni udio [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L = broj laboratorija

n = broj pojedinačnih vrijednosti

s_r = standardna devijacija ponovljivosti

s_R = standardna devijacija obnovljivosti

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

(*) Analyst, 1995., 120, str. 2175–2180.

(**) Udio koji je naveo proizvođač.

(+) Hrana za životinje pripremljena u laboratoriju.

H. ODREĐIVANJE AMPROLIJEVA HIDROKLORIDA

1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinijev klorid monohidroklorid

1. Svrha i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje razine amprolija u hrani za životinje. Granica detekcije iznosi 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira smjesom metanola i vode. Nakon razrjeđivanja mobilnom fazom i membranske filtracije, udio amprolija određuje se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s izmjenom kationa uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, za HPLC

3.3. Voda, za HPLC

3.4. Otopina natrijevog dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l

U graduiranoj tikvici volumena 1 000 ml otopi se u vodi (točka 3.3.) 13,80 g natrijevog dihidrogen fosfat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.5. Otopina natrijevog perklorata, c = 1,6 mol/l.

U graduiranoj tikvici volumena 1 000 ml otopi se u vodi (točka 3.3.) 224,74 g natrijevog perklorat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.6. Mobilna faza za HPLC (vidjeti napomenu pod točkom 9.1.).

Smjesa acetonitrila (točka 3.2.), otopina natrijevog dihidrogen fosfata (točka 3.4.) i otopina natrijevog perklorata (točka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v) Prije uporabe filtrira se membranskim filtrom 0,22 µm (točka 4.3.), a otopina se otplini (npr. najmanje 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4.)).

3.7. Standardna tvar: čisti amprolij, 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinijev klorid, E 750 (vidjeti točku 9.2.)

▼ M9

3.7.1. Temeljna standardna otopina amprolija, 500 µg/ml

Odvagne se 50 mg amprolija (točka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 100 ml, otopi u 80 ml metanola (točka 3.1.) i tikvicu 10 minuta drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4.). Nakon obrade ultrazvukom otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.7.2. Intermedijarna standardna otopina amprolija, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 5,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.7.1.) u građuiranu tikvicu volumena 50 ml, dopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom (točka 3.8.) i promiješa. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.7.3. Kalibracijske otopine

U seriju građuiranih tikvica volumena 50 ml prenese se 0,5, 1,0, i 2,0 ml intermedijarne standardne otopine (točka 3.7.2.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.6.) i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentracijama amprolija 0,5, 1,0 i 2,0 µg/ml. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.8. Ekstrakcijsko otapalo

Smjesa metanola (točka 3.1.) i vode 2 + 1 (v + v)

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje prikladnim za injektiranje volumena od 100 µl

4.1.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju 125 mm × 4 mm s izmjenom kationa, Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 ili 10 µm, ili ekvivalentna

4.1.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda

4.2. Membranski filter, materijal PTFE, 0,45 µm

4.3. Membranski filter, 0,22 µm

4.4. Ultrazvučna kupelj

4.5. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica

5. Postupak5.1. *Općenito*

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Za provedbu testa iskorištenja (točka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni ni amprolij ni interferirajuće tvari. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost amprolija i interferirajućih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine amprolija slične onoj koja se nalazi u uzorku. Za dobivanje koncentracije od 100 mg/kg, prenese se 10,0 ml temeljne standardne otopine (točka 3.7.1.) u konusnu tikvicu volumena 250 ml i otopina otpari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepa probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2.).

▼ **M9**

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidjeti točku 5.1.1.), test iskorištenja može se provesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati količinom amprolija sličnom onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. Premiksi (udio amprolija < 1 %) i hrana za životinje

Odvagne se 5 – 40 g uzorka, ovisno o udjelu amprolija, s preciznošću od 0,01 g, prenese u konusnu tikvicu volumena 500 ml i doda 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom miješalicom (točka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6.) do udjela amprolija od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa (vidjeti napomenu pod točkom 9.3.). Filtrira se 5 – 10 ml tako razrijeđene otopine kroz membranski filter (točka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (udio amprolija ≥ 1 %)

Odvagne se 1 – 4 g premiksa, ovisno o udjelu amprolija, s preciznošću od 0,001 g, prenese u konusnu tikvicu volumena 500 ml i doda 200 ml ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom miješalicom (točka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6.) do udjela amprolija od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa. Filtrira se 5 – 10 ml tako razrijeđene otopine kroz membranski filter (točka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (točka 5.3.).

5.3. *HPLC određivanje*

5.3.1. Parametri:

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.1.1.):	125 mm × 4 mm s izmjenom kationa, Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 ili 10 µm, ili ekvivalentna
---	---

Mobilna faza (točka 3.6.):	Smjesa acetonitrila (točka 3.2.), otopina natrijevog dihidrogen fosfata (točka 3.4.) i otopina natrijevog perklorata (točka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
----------------------------	--

Brzina protoka:	0,7 – 1 ml/min
-----------------	----------------

Valna duljina detekcije:	264 nm
--------------------------	--------

Volumen za injektiranje:	100 µl
--------------------------	--------

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.7.3.) koncentracije 1,0 µg/ml sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.7.3.) i za svaku koncentraciju odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

▼ M9**5.3.3. Otopina uzorka**

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.2.), pri čemu se koristi jednaki volumen kao za kalibracijsku otopinu, a zatim se odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova amprolija.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova amprolija otopine uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.3.2.).

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

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

V = volumen ekstrakcijskog otapala (točka 3.8.) u ml u skladu s točkom 5.2. (tj. 200 ml);

c = koncentracija amprolija u ekstraktu uzorka (točka 5.2.) u µg/ml;

f = faktor razrjeđenja u skladu s 5.2.;

m = masa testnog dijela u gramima.

7. Validacija rezultata**7.1. Identifikacija**

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.7.3.) koncentracije 2.0 µg/ml.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.) doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.7.3.). Količina dodanog amprolija mora biti slična količini amprolija u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika amprolija uzimajući u obzir dodanu količinu i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici maksimalne visine mora biti unutar ± 10 % početne širine pika amprolija u neobogaćenom ekstraktu uzorka.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.

(b) Između 210 i 320 nm spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbancije standardnog analita.

▼ **M9**

- (c) Između 210 i 320 nm spektri uzlaznog dijela, vrha i silaznog dijela krivulje ekstrakta uzorka ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar raspona 10 – 100 % relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između spektara ni na jednoj točki ne prelazi 15 % apsorbancije spektra najviše točke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dva usporedna određivanja provedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

- 15 % više vrijednosti za udio amprolija od 25 – 500 mg/kg,
- 75 mg/kg za udio amprolija od 500 – 1 000 mg/kg,
- 7,5 % više vrijednosti za udio amprolija veći od 1 000 mg/kg.

7.3. *Iskorištenje*

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 90 %.

8. **Rezultati međulaboratorijske studije**

Provedena je međulaboratorijska studija u kojoj su analizirana tri uzorka hrane za perad (uzorci 1–3), jedan uzorak mineralne mješavine (uzorak 4) i jedan uzorak premiksa (uzorak 5). Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Uzorak 1 (slijepi uzorak hrane za životinje)	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Srednja vrijednost [mg/kg]	–	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	–	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	–	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	–	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	–	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominalni udio [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: broj laboratorija

n: broj pojedinačnih vrijednosti

s_r : standardna devijacija ponovljivosti

CV_r: koeficijent varijacije ponovljivosti

s_R : standardna devijacija obnovljivosti

CV_R: koeficijent varijacije obnovljivosti

▼ M9**9. Napomene**

- 9.1. Ako uzorak sadržava tiamin, pik tiamina u kromatogramu pojavljuje se malo prije pika amprolija. U skladu s ovom metodom, amprolij i tiamin se moraju razdvojiti. Ako se amprolij i tiamin ne razdvajaju na koloni (točka 4.1.1.) korištenoj u ovoj metodi, metanolom se zamijeni do 50 % acetonitrila u mobilnoj fazi (točka 3.6.).
- 9.2. Prema Britanskoj farmakopeji, najviše točke spektra otopine amprolija ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) u klorovodičnoj kiselini ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) nalaze se na 246 nm i 262 nm. Apsorbancija iznosi 0,84 na 246 nm i 0,80 na 262 nm.
- 9.3. Ekstrakt se uvijek mora razrijediti mobilnom fazom, u suprotnom bi se vrijeme retencije pika amprolija moglo znatno pomaknuti zbog promjena ionske sile.

I. ODREĐIVANJE NARAZINA

Udio narazina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tekućinske kromatografije s postkolonskom derivatizacijom

J. ODREĐIVANJE NIKARBAZINA

Udio nikarbazina određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN 15782 Hrana za životinje – Određivanje nikarbazina – Metoda tekućinske kromatografije visokog učinka.

K. ODREĐIVANJE DEKOKVINATA

Udio dekokvinata određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN 16162 Hrana za životinje – Određivanje dekokinata HPLC-om s fluorescentnom detekcijom.

▼ **M9****L. ODREĐIVANJE MONENZINA**

Udio monenzina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tekućinske kromatografije s postkolonskom derivatizacijom.

M. ODREĐIVANJE SALINOMICINA

Udio salinomicina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tekućinske kromatografije s postkolonskom derivatizacijom.

N. ODREĐIVANJE SEMDURAMICINA

Udio semduramicina određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidiostatika na razini aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % te neregistriranih kokcidiostatika i jednog antibiotika na razini nižoj od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u normi EN 16158 Hrana za životinje – Određivanje udjela semduramicina – Metoda tekućinske kromatografije upotrebom trojnog analitičkog pristupa.

O. EN NORME

Za primjenu članka 34. stavka 2. točke (a) Uredbe (EU) 2017/625 relevantne su sljedeće EN norme:

EN ISO 30024 Hrana za životinje – Određivanje aktivnosti fitaze

EN 17050 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje joda primjenom anionskog izmjenjivača ICP-MS

EN 17550 Hrana za životinje: Određivanje karotenoida u krmnim smjesama i premiksima tekućinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC) – UV detekcija (HPLC-UV)

EN 15784 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Bacillus* spp.

▼ M9

EN 15785 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Izolacija i brojanje *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Pediococcus* spp.

EN 15787 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Lactobacillus* spp. koji se upotrebljava kao aditiv u hranu za životinje

EN 15788 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. koji se upotrebljava kao aditiv u hranu za životinje

EN 15789 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Saccharomyces cerevisiae* koji se upotrebljava kao aditiv u hranu za životinje

EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, željeza, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES (za analizu dodataka hrani za životinje kobalta i molibdena)

EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcija, natrija, fosfora, magnezija, kalija, sumpora, željeza, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod tlakom (za analizu kobalta kao dodatka hrani za životinje)

EN 16159 Hrana za životinje – Određivanje selena atomskom apsorpcijskom spektrometrijom hidridni postupak (HGAAS) nakon mikrovalne razgradnje (razgradnja sa 65 % dušičnom kiselinom i 30 % vodikovim peroksidom)

EN 17053: Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje elemenata u tragovima, teških metala i ostalih elemenata u hrani metodom ICP-MS (multimetoda) (za analizu kobalta, molibdena i selena kao dodataka hrani za životinje)

▼ M9

PRILOG V.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU NEPOŽELJNIH TVARI U HRANI ZA ŽIVOTINJE

A ODREĐIVANJE RAZINA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-a

POGLAVLJE I.

METODE UZORKOVANJA I TUMAČENJE REZULTATA ANALIZE

1. Područje primjene i definicije

Uzorci za službenu kontrolu razina polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD-i), polikloriranih dibenzofurana (PCDF-i), polikloriranih bifenila sličnih dioksinima (PCB-i) ⁽¹⁾ i PCB-a koji nisu slični dioksinima u hrani za životinje uzimaju se u skladu s odredbama Priloga I. Primjenjuju se količinski zahtjevi za kontrolu tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje kako je utvrđeno u točki 5.1. Priloga I. Skupni uzorci dobiveni na taj način smatraju se reprezentativnima za serije ili podserije iz kojih su uzeti. Sukladnost s najvišim dopuštenim količinama određenima Direktivom 2002/32/EZ utvrđuje se na temelju količina utvrđenih na laboratorijskim uzorcima.

⁽¹⁾ Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za PCDD-e, PCDF-e i PCB-e slične dioksinima: WHO-TEF-ovi za procjenu rizika za zdravlje ljudi na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost kemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u lipnju 2005. (Martin van den Berg et al., „The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds”, *Toxicological Sciences*, 93(2), str. 223–241. (2006.)).

Kongener	TEF vrijednost	Kongener	TEF vrijednost
Dibenzo-p-dioksini („PCDD-i”) i dibenzo-p-furani („PCDF-i”)		„Dioksinima slični” PCB-i	
		Ne-orto PCB-i + mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne-orto PCB-i	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Korištene kratice: „T” = tetra; „Pe” = penta; „Hx” = heksa; „Hp” = hepta; „O” = okta; „CDD” = klordibenzodioksin; „CDF” = klordibenzofuran; „CB” = klorbifenil.

▼ **M9**

Za potrebe ovog dijela primjenjuju se definicije utvrđene u Prilogu I. Provedbenoj uredbi Komisije (EU) 2021/808 ⁽²⁾

Uz te definicije, za potrebe ovog dijela primjenjuju se i sljedeće definicije:

„Orijentacijske metode” znači metode koje se upotrebljavaju za odabir uzoraka s količinama PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. Njima se omogućuje troškovno učinkovita velika propusnost uzoraka i tako povećava mogućnost za otkrivanje novih incidenata velike izloženosti i rizika za zdravlje potrošača. Orijetacijske metode temelje se na bioanalitičkim ili GC/MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze *cut-off* vrijednost upotrijebljenu za provjeru sukladnosti s najvećom dopuštenom količinom provjeravaju se potpunom ponovljenom analizom originalnog uzorka upotrebom potvrdne metode.

„Potvrdne metode” znači metode kojima se osiguravaju potpune ili dopunske informacije kojima se omogućuje nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. U takvim metodama koriste se plinska kromatografija/masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija/tandemska masena spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Sukladnost serije ili podserije s najvećom dopuštenom količinom

2.1. PCB-i koji nisu slični dioksinima

Serijska ili podserijska u skladu je s najvećom dopuštenom količinom ako rezultat analize za zbroj PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 (dalje u tekstu PCB-i koji nisu slični dioksinima) ne prelazi najveću dopuštenu količinu utvrđenu Direktivom 2002/32/EZ, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost ⁽³⁾. Serijska ili podserijska nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom kako je utvrđena Direktivom 2002/32/EZ ako srednja vrijednost dvaju rezultata analize navedenih kao gornja granica ⁽⁴⁾, dobivenih dvostrukom analizom ⁽⁵⁾, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, nedvojbeno prelazi najveću dopuštenu količinu, odnosno za ocjenu sukladnosti upotreb-ljava se analizirana koncentracija nakon oduzimanja proširene mjerne nesigurnosti.

⁽²⁾ Provedbena uredba Komisije (EU) 2021/808 od 22. ožujka 2021. o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ (SL L 180, 21.5.2021., str. 84.).

⁽³⁾ Načela opisana u smjernicama *Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry* (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) poštuju se ako su primjenjiva.

⁽⁴⁾ Koncept „gornje granice” zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera. Koncept „donje granice” zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera. Koncept „srednje granice” zahtijeva primjenu pola vrijednosti granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera.

⁽⁵⁾ Dvostruka analiza: odvojena analiza analita od interesa upotrebom drugog alikvota istog homogeniziranog uzorka. Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostrukom analizom iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za metode u kojima se upotrebljava interni standard obilježen izotopom ¹³C za relevantne analite dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja nije sukladan. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutarnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Ako se analiza provodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje s dvostrukom analizom može se izostaviti ako se uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću mogu povezati s incidentom kontaminacije, a utvrđena količina znatno je veća od najveće dopuštene količine.

▼ M9

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se upotrebom faktora pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %. Serija ili podserija nije sukladna ako srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti, umanjena za proširenu nesigurnost srednje vrijednosti, prelazi najveću dopuštenu količinu.

Pravila koja su navedena u prethodnim odlomcima ove točke primjenjuju se na rezultat analize dobiven na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe drugog stručnog mišljenja ili upućivanja primjenjuju se nacionalni propisi.

2.2. PCDD/PCDF-i i dioksinima slični PCB-i

Serija ili podserija u skladu je s najvećom dopuštenom količinom ako rezultat pojedinačne analize

- provedene orijentacijskom metodom s udjelom lažno sukladnih rezultata manjim od 5 % pokazuje da količina ne prelazi odgovarajuću najveću dopuštenu količinu PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ,
- provedene potvrdnom metodom ne prelazi odgovarajuću najveću dopuštenu količinu PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a kako je propisano u Direktivi 2002/32/EZ, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

Za orijentacijske testove treba odrediti *cut-off* vrijednost za odluke o sukladnosti uzorka s odgovarajućim najvećim dopuštenim količinama određenima za PCDD/PCDF-e ili za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.

Serija ili podserija nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom kako je utvrđena Direktivom 2002/32/EZ ako srednja vrijednost dvaju rezultata analize navedenih kao gornja granica ⁽⁶⁾ dobivenih dvostrukom analizom ⁽⁷⁾ upotrebom potvrdne metode, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost, nedvojbeno prelazi najveću dopuštenu količinu, odnosno za ocjenu sukladnosti upotrebljava se analizirana koncentracija nakon oduzimanja proširene mjerne nesigurnosti.

Proširena mjerna nesigurnost izračunava se upotrebom faktora pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %. Serija ili podserija nije sukladna ako srednja vrijednost izmjerenih vrijednosti, umanjena za proširenu nesigurnost srednje vrijednosti, prelazi najveću dopuštenu količinu.

⁽⁶⁾ Koncept „gornje granice” zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Koncept „donje granice” zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera TEQ-u. Koncept „srednje granice” zahtijeva primjenu pola vrijednosti granice kvantifikacije za izračun svakog nekvantificiranog kongenera TEQ-u.

⁽⁷⁾ Općenito, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. poglavlja C točke 3. Međutim, za potvrdne metode u kojima se upotrebljava interni standard obilježen izotopom ¹³C za relevantne analite dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja nije sukladan. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutarnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Ako se analiza provodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje s dvostrukom analizom može se izostaviti ako se uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću mogu povezati s incidentom kontaminacije, a utvrđena količina znatno je veća od najveće dopuštene količine.

▼ **M9**

Zbroj procijenjenih proširenih nesigurnosti za odvojene analitičke rezultate PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a upotrebljava se za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.

Pravila koja su navedena u prethodnim odlomcima ove točke primjenjuju se na rezultat analize dobiven na uzorku za službenu kontrolu. U slučaju analize za potrebe prizivnog postupka ili upućivanja primjenjuju se nacionalni propisi.

3. **Rezultati koji prelaze pragove za pokretanje postupka kako je utvrđeno u Prilogu II. Direktivi 2002/32/EZ**

Pragovi za pokretanje postupka služe za odabir uzoraka u slučajevima kad je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i poduzeti mjere za njezino smanjenje ili uklanjanje. Orijentacijskim metodama utvrđuju se odgovarajuće *cut-off* vrijednosti za odabir tih uzoraka. Ako su potrebni znatni naponi za utvrđivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije, primjereno je potvrditi prekoračenje pragova za pokretanje postupka dvostrukom analizom upotrebom potvrdne metode i uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost ⁽⁸⁾.

POGLAVLJE II.

Priprema uzorka i zahtjevi za analitičke metode koje se koriste za službenu kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF-i) i dioksinima sličnih PCB-a u hrani za životinje

1. **Područje primjene**

Zahtjevi iz ovog poglavlja primjenjuju se kad se hrana za životinje analizira za službenu kontrolu količina 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a te u pogledu pripreme uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne svrhe, uključujući kontrole koje provodi subjekt u poslovanju s hranom za životinje za osiguravanje sukladnosti s odredbama Uredbe (EZ) br. 183/2005 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽⁹⁾.

Prisutnost PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u hrani za životinje može se pratiti s pomoću dvije različite vrste analitičkih metoda:

(a) Orijentacijske metode

Cilj je orijentacijskih metoda odabir uzoraka s količinama PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. Orijentacijskim metodama omogućuje se troškovno učinkovita velika propusnost uzoraka i tako povećava mogućnost za otkrivanje novih incidenata velike izloženosti i rizika za zdravlje potrošača. Cilj je njihove primjene izbjeći lažno sukladne rezultate. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC-MS metode.

Orijentacijske metode omogućuju usporedbu rezultata analize s *cut-off* vrijednošću, na temelju čega se potvrđuje ili isključuje moguće prekoračenje najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u uzorcima za koje se sumnja da su nesukladni s najvećom dopuštenom količinom određuje se ili potvrđuje potvrdnom metodom.

Osim toga, orijentacijskim metodama mogu se dobiti pokazatelji količina PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a koje su prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda rezultati se izražavaju kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-kemijskih GC-MS metoda rezultati izražavaju kao

⁽⁸⁾ Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješki 5. za najveće dopuštene količine.

⁽⁹⁾ Uredba (EZ) br. 183/2005 Europskog parlamenta i Vijeća od 12. siječnja 2005. o utvrđivanju zahtjeva u pogledu higijene hrane za životinje (SL L 35, 8.2.2005., str. 1.).

▼ **M9**

ekvivalenti toksičnosti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje sukladnosti ili sumnje na nesukladnost ili prekoračenja pragova za pokretanje postupka i pokazuju raspon količina u slučaju daljnje analize s pomoću potvrđnih metoda. Oni nisu prikladni za namjene kao što su ocjena pozadinskih razina, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja količina ili ponovna ocjena pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina.

(b) *Potvrđne metode*

Potvrđne metode omogućuju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u uzorku i pružaju cjelovite informacije o količini pojedinačnih kongenera. Stoga te metode omogućuju kontrolu najvećih dopuštenih količina i pragova za pokretanje postupka, uključujući potvrdu rezultata dobivenih orijentacijskim metodama. Osim toga, rezultati se mogu koristiti za druge namjene, kao što su određivanje niskih pozadinskih razina kod praćenja hrane za životinje, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti i stvaranje baze podataka za eventualnu ponovnu ocjenu pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina. Važni su i za određivanje profila kongenera kako bi se utvrdio izvor moguće kontaminacije. U takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje sukladnosti ili nesukladnosti s najvećom dopuštenu količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. **Pozadina**

Za izračun koncentracija TEQ, koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s odgovarajućim faktorom ekvivalentne toksičnosti (TEF) (vidjeti bilješku 1. u poglavlju I.) i zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinima sličnih spojeva izražena kao TEQ.

Za potrebe ovog dijela A, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najmanji udio analita koji se može izmjeriti s razumnom statističkom sigurnošću, pri čemu moraju biti ispunjeni kriteriji identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – Određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a primjenom GC/HRMS i indikatorskih pokazatelja PCB-a primjenom GC/HRMS), i/ili u metodama EPA 1613 i 1668 kako su revidirane.

Granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

- (a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi odziv instrumenta na dva različita iona koji se prate, uz omjer signala i šuma (S/N) 3: 1 za manje osjetljivi signal neobrađenih podataka; ili
- (b) ako zbog tehničkih razloga izračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, točka najniže koncentracije na kalibracijskoj krivulji koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičkog niza uzoraka) odstupanje od prosječnog relativnog faktora odziva izračunanog za sve točke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka. Granica kvantifikacije (LOQ) izračunava se iz točke najniže koncentracije uzimajući u obzir iskorištenje internih standarda i unos uzorka.

▼ **M9**

Bioanalitičke orijentacijske metode ne daju rezultate na razini kongenera, već samo pokazatelje ⁽¹⁰⁾ TEQ vrijednosti, izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ) kako bi se uzela u obzir činjenica da zahtjeve načela TEQ možda ne ispunjavaju svi spojevi prisutni u ekstraktu uzorka koji proizvedu odziv pri ispitivanju.

Orijentacijske i potvrđne metode mogu se koristiti za kontrolu određene matrice samo ako su metode dovoljno osjetljive za pouzdano otkrivanje količina na razini praga za pokretanje postupka ili najveće dopuštene količine.

3. **Zahtjevi za osiguravanje kvalitete**

- 3.1. U svakoj fazi postupka uzorkovanja i analize poduzimaju se mjere za sprečavanje unakrsne kontaminacije.
- 3.2. Uzorci se čuvaju i prevoze u staklenim, aluminijskim, polipropilenskim ili polietilenskim posudama koje su prikladne za čuvanje bez utjecaja na količine PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u uzorcima. Iz posude za uzorke treba ukloniti tragove papirne prašine.
- 3.3. Skladištenje i prijevoz uzorka provode se tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane za životinje.
- 3.4. Ako je primjenjivo, svaki se laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se dokazano postiže potpuna homogenizacija (npr. mljevenje na veličinu koja prolazi kroz sito veličine 1 mm). Ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.
- 3.5. Provodi se kontrola reagensa, staklenog pribora i opreme zbog mogućeg utjecaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ vrijednostima.
- 3.6. Obavlja se slijepa proba tako da se provede cijeli analitički postupak, ali bez uzorka.
- 3.7. Za bioanalitičke metode sav stakleni pribor i otapala koji se koriste u analizi ispituju se kako bi se potvrdilo da ne sadržavaju spojeve koji utječu na detekciju ciljnih spojeva u radnom području. Stakleni pribor ispire se otapalima ili grije na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinima sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njegove površine.
- 3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se ispune zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog područja koje uključuje koncentracije najvećih dopuštenih količina ili praga za pokretanje postupka.
- 3.9. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za proizvode koji se ispituju moraju biti u skladu s međunarodno priznatim smjernicama, tj. s normom EN ISO 6498.

⁽¹⁰⁾ Bioanalitičke metode nisu specifične za kongenere koji su uključeni u sustav TEF. U ekstraktu uzorka mogu biti prisutni i drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor arilnih ugljikovodika (AhR), što pridonosi općem odzivu. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena, već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

▼ **M9****4. Zahtjevi za laboratorije**

4.1. U skladu s odredbama Uredbe (EU) 2017/625, laboratorije akreditira priznato tijelo koje djeluje u skladu s uputama ISO/IEC Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju postupke osiguravanja kvalitete analitičkih postupaka. Laboratoriji se akreditiraju u skladu s normom EN ISO/IEC 17025. Trebaju se poštovati načela opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCDD/PCDF-a i PCB-a. ⁽¹¹⁾

4.2. Sposobnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u relevantnim matricama hrane za životinje i rasponima koncentracija.

4.3. Laboratoriji koji primjenjuju orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju blisko surađivati s laboratorijima koji primjenjuju potvrdne metode, radi kontrole kvalitete i radi potvrde rezultata analize sumnjivih uzoraka.

5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF-i) i dioksinima slične PCB-e**5.1. Nisko radno područje i granice kvantifikacije**

Za PCDD/PCDF-e osjetljivost kvantifikacije mora biti u gornjem femtogramskom rasponu (10^{-15} g) zbog iznimne toksičnosti nekih od tih spojeva. Za većinu kongenera PCB-a dovoljna je granica kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g). Za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinima sličnih PCB-a (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog područja mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-a dovoljna je granica kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

5.2.1. Potrebno je razlikovati PCDD/PCDF-e i dioksinima slične PCB-e od mnoštva drugih istodobno ekstrahiranih i možda interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su za nekoliko redova veličine veće od koncentracija analita od interesa. Kod GC-MS metoda potrebno je razlikovati različite vrste kongenera, na primjer toksične (npr. sedamnaest 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF-a i dvanaest dioksinima sličnih PCB-a) i druge kongenere.

5.2.2. Bioanalitičke metode moraju omogućiti određivanje ciljnih spojeva kao zbroja PCDD/PCDF-a i/ili dioksinima sličnih PCB-a. Uzorci se pročišćavaju kako bi se uklonili spojevi koji uzrokuju lažno nesukladne rezultate ili spojevi koji mogu smanjiti odziv i prouzročiti lažno sukladne rezultate.

⁽¹¹⁾ „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” [https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf], „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food” [https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf].

▼ **M9**

- 5.3. *Visoka točnost (istinitost i preciznost, očito iskorištenje pri biološkim testovima)*
- 5.3.1. Kod GC-MS metoda određivanje mora dati valjanu procjenu stvarne koncentracije u uzorku. Potrebna je visoka točnost kako bi se spriječilo odbacivanje rezultata analize uzorka na temelju niske pouzdanosti utvrđene TEQ vrijednosti. Točnost se izražava kao *istinitost* (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izraženo kao postotak te vrijednosti) i *preciznost* (RSD_R relativna standardna devijacija dobivena iz rezultata dobivenih u uvjetima obnovljivosti).
- 5.3.2. Kod bioanalitičkih metoda treba odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima. Očito iskorištenje pri biološkim testovima znači BEQ vrijednost izračunana iz kalibracijske krivulje TCDD-a ili PCB-a 126, korigirana za slijepu vrijednost i zatim podijeljena s TEQ vrijednošću utvrđenom potvrdnom metodom. Svrha te metode je korigirati faktore kao što su gubitak PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih spojeva tijekom postupka ekstrakcije i pročišćavanja, koekstrahirani spojevi koji povećavaju ili smanjuju odziv (agonistički i antagonistički učinci), kvaliteta prilagodbe krivulje ili razlike između TEF vrijednosti i vrijednosti relativne potentnosti (REP). Očito iskorištenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim profilima kongenera u području količine od interesa.
- 5.4. *Validacija u rasponu najveće dopuštene količine i opće mjere kontrole kvalitete*
- 5.4.1. Laboratoriji tijekom validacijskog postupka i rutinske analize moraju dokazati učinkovitost metode u rasponu najveće dopuštene količine, npr. na razini jednakoj 0,5 x, 1 x i 2 x najveće dopuštene količine s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize.
- 5.4.2. Kao mjere unutarnje kontrole kvalitete provode se redovite slijepe probe i pokusi s obogaćenim uzorcima ili analiza kontrolnih uzoraka (po mogućnosti certificiranih referentnih materijala). Za slijepe probe, pokuse s obogaćenim uzorcima ili analizu kontrolnih uzoraka bilježe se i provjeravaju dijagrami kontrole kvalitete kako bi se osiguralo da je provedba analiza u skladu sa zahtjevima.
- 5.5. *Granica kvantifikacije*
- 5.5.1. Određivanje granice kvantifikacije (LOQ) nije nužan zahtjev za bioanalitičke orijentacijske metode, ali treba dokazati da se predmetnom metodom može razlikovati slijepa vrijednost od *cut-off* vrijednosti. Pri navođenju vrijednosti BEQ određuje se prag izvješćivanja zbog postupanja s uzorcima za koje je odziv ispod tog praga. Treba dokazati da se prag izvješćivanja razlikuje najmanje za faktor tri od slijepih uzoraka metode, s odzivom ispod radnog područja. Stoga se on izračunava iz uzoraka koji sadržavaju ciljne spojeve u području zahtijevane najmanje količine, a ne iz omjera S/N ili slijepe probe.
- 5.5.2. LOQ za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina najveće dopuštene količine.
- 5.6. *Analitički kriteriji*
- Za pouzdane rezultate iz potvrdnih ili orijentacijskih metoda moraju se ispuniti sljedeći kriteriji u rasponu najveće dopuštene količine za TEQ ili BEQ vrijednost, koje su utvrđene kao ukupna TEQ ili ukupna BEQ vrijednost (kao zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a) ili odvojeno za PCDD/PCDF-e i dioksinima slične PCB-e.

▼ **M9**

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-kemijskim metodama	Potvrđne metode
Učestalost lažno sukladnih rezultata (*)	< 5 %	
Istinitost		–20 % do +20 %
Ponovljivost (RSD _r)	< 20 %	
Intermedijarna preciznost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) U odnosu na najveće dopuštene količine.

5.7. Posebni zahtjevi za orijentacijske metode

5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u točki 6. Za stanične bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u točki 7.

5.7.2. Laboratoriji koji primjenjuju orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju blisko surađivati s laboratorijima koji primjenjuju potvrđne metode.

5.7.3. Tijekom rutinske analize potrebno je provesti provjeru učinkovitosti orijentacijske metode s pomoću kontrole kvalitete analize i stalnog vrednovanja metode. Mora postojati trajni program za kontrolu sukladnih rezultata.

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja staničnog odgovora i citotoksičnosti:

20 % ekstrakata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez dodanog i s dodanim 2,3,7,8-TCDD-om, u količini koja odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka, kako bi se provjerilo je li odziv možda smanjen zbog interferirajućih tvari prisutnih u ekstraktu uzorka. Izmjerena koncentracija obogaćenog uzorka uspoređuje se sa zbrojem koncentracije neobogaćenog ekstrakta i koncentracije obogaćenja. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25 % manja od izračunate koncentracije (zbroja), to je pokazatelj mogućeg smanjenja signala i predmetni uzorak podvrgava se potvrđnoj analizi GC-HRMS metodom. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvalitete.

5.7.5. Kontrola kvalitete sukladnih uzoraka:

Približno 2 do 10 % sukladnih uzoraka, ovisno o matrici uzorka i iskustvu laboratorija, potvrđuje se primjenom GC/HRMS-a.

5.7.6. Određivanje udjela lažno sukladnih rezultata na temelju podataka o kontroli kvalitete:

Određuje se udio lažno sukladnih rezultata iz orijentacijskih metoda analize uzoraka ispod i iznad najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Stvarni udio lažno sukladnih rezultata mora biti ispod 5 %. Ako je iz kontrole kvalitete sukladnih uzoraka dostupno najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/skupini matrica, zaključci

▼ **M9**

o udjelu lažno sukladnih rezultata donose se na temelju te baze podataka. Rezultati iz uzoraka analiziranih u međulaboratorijskim ispitivanjima ili tijekom incidenata kontaminacije, koji obuhvaćaju raspon koncentracije do npr. 2 x najveće dopuštene količine, mogu se također uključiti u bazu od najmanje od 20 rezultata za procjenu udjela lažno sukladnih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće profile kongenera iz različitih izvora.

Iako orijentacijske metode u prvom redu služe za otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno sukladnih rezultata jest najveća dopuštena količina, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost potvrdne metode.

- 5.7.7. Mogući nesukladni uzorci iz orijentacijske metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom analize. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu udjela lažno nesukladnih rezultata. Kod orijentacijskih metoda udio lažno nesukladnih rezultata je postotak rezultata za koje je potvrdnom analizom potvrđeno da su sukladni, dok je prethodnom analizom orijentacijskom metodom utvrđeno da je uzorak možda nesukladan. Procjena prednosti orijentacijske metode temelji se na usporedbi lažno nesukladnih uzoraka s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Taj udio mora biti dovoljno nizak da uporaba orijentacijske metode bude korisna.

- 5.7.8. U uvjetima validacije bioanalitičke metode moraju valjano pokazati količinu TEQ, izračunanu i izraženu kao BEQ.

I kod bioanalitičkih metoda provedenih u ponovljenim uvjetima unutar-laboratorijski RSD_r u pravilu je manji nego u uvjetima obnovljivosti (RSD_R).

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati GC-MS metode koje se koriste u svrhu orijentacije ili potvrđivanja

- 6.1. *Prihvatljive razlike između gornje i donje granice kod rezultata WHO-TEQ*

Za potvrđivanje prekoračenja najveće dopuštene količine ili, prema potrebi, praga za pokretanje postupka razlika između gornje granice i donje granice ne smije biti veća od 20 %.

- 6.2. *Kontrola iskorištenja*

- 6.2.1. Dodavanje internih standarda PCDD/PCDF-a supstituiranih klorom na položaju 2,3,7,8 i obilježenih izotopom ^{13}C i internih standarda dioksinima sličnih PCB-a obilježenih izotopom ^{13}C provodi se na samom početku analitičke metode, tj. prije ekstrakcije, kako bi se validirao analitički postupak. Dodaje se najmanje jedan kongener za svaku tetra- do okta-kloriranu homolognu skupinu za PCDD/PCDF-e i najmanje jedan kongener za svaku homolognu skupinu za dioksinima slične PCB-e (odnosno najmanje jedan kongener za svaku funkciju snimanja iona odabranih masenom spektrometrijom koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). U slučaju potvrdnih metoda koristi se svih 17 internih standarda PCDD/PCDF-a supstituiranih na položaju 2,3,7,8 i obilježenih izotopom ^{13}C i svih 12 internih standarda dioksinima sličnih PCB-a obilježenih izotopom ^{13}C .

▼ **M9**

6.2.2. Relativne faktore odziva treba utvrditi i za kongenere za koje nije dodan analog obilježen izotopom ^{13}C , i to upotrebom odgovarajućih kalibracijskih otopina.

6.2.3. Za hranu za životinje biljnog i životinjskog podrijetla koja sadržava manje od 10 % masti interni standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu za životinje životinjskoga podrijetla u kojoj je udio masti veći od 10 % interni standardi se dodaju prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, ovisi o fazi u kojoj se interni standardi dodaju.

6.2.4. Prije GC-MS analize dodaje se 1 ili 2 (surogat) standarda za određivanje iskorištenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode iskorištenje pojedinačnih internih standarda mora biti između 60 % i 120 %. Prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, pod uvjetom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10 % ukupne TEQ vrijednosti (dobivene na temelju zbroja PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). Za orijentacijske metode GC-MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30 % i 140 %.

6.3. *Uklanjanje interferirajućih tvari*

— Odvajanje PCDD/PCDF-a od interferirajućih kloriranih spojeva kao što su PCB-ovi koji nisu slični dioksinima i klorirani difenil eteri provodi se odgovarajućim kromatografskim tehnikama (najbolje s pomoću kolone s florisilom, aluminijevim oksidom i/ili ugljenom).

— Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom mora biti < 25 % od pika do pika između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibracija sa standardnom krivuljom*

Raspon kalibracijske krivulje obuhvaća relevantni raspon najvećih dopuštenih količina ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. *Posebni kriteriji za potvrdne metode*

— Za GC-HRMS:

kod HRMS-a razlučivost u pravilu mora biti veća ili jednaka 10 000 za cijeli raspon masa pri vrijednosti minimuma od 10 %,

ispunjavanje daljnjih kriterija za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – Određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a primjenom GC/HRMS i indikatorskih pokazatelja PCB-a primjenom GC/HRMS), i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

— Za GC-MS/MS:

▼ **M9**

praćenje barem dva specifična iona prekursora, od kojih svaki ima jedan odgovarajući prijelazni produktni ion za sve označene i neoznačene analite u okviru analize;

najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od $\pm 15\%$ za odabrane prijelazne produktne ione u usporedbi s izračunanim ili izmjerenim vrijednostima (prosjeak iz kalibracijskih standarda), primjenjujući identične MS/MS uvjete, posebno energiju kolizije i tlak plina kolizije, za svaki prijelaz analita.

razlučivost za svaki kvadropol treba biti jednaka ili bolja od razlučivosti masene jedinice (razlučivost masene jedinice: razlučivost dovoljna da dva pika odvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjile moguće interferencije na analitima od interesa.

ispunjavanje daljnjih kriterija kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje – Određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a primjenom GC/HRMS i indikatorskih pokazatelja PCB-a primjenom GC/HRMS), i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obveze da se koristi GC-HRMS.

7. Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode

Bioanalitičke metode su metode koje se temelje na uporabi bioloških načela kao što su stanični testovi, receptorski testovi i imunološki testovi. U ovoj točki utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijskom metodom uzorak se u načelu klasificira kao sukladan ili kao uzorak za koji se sumnja da je nesukladan. U tu svrhu izračunana vrijednost BEQ uspoređuje se s *cut-off* vrijednošću (vidjeti točku 7.3.). Uzorci ispod *cut-off* vrijednosti smatraju se sukladnima, a za uzorke jednake ili iznad *cut-off* vrijednosti sumnja se da nisu sukladni te ih je potrebno analizirati potvrdnom metodom. U praksi se BEQ vrijednost koja je jednaka dvije trećine najveće dopuštene količine može se koristiti kao *cut-off* vrijednost, pod uvjetom da se osigura udio lažno sukladnih rezultata manji od 5 % i prihvatljiv udio lažno nesukladnih rezultata. S odvojenim najvećim dopuštenim količinama za PCDD/PCDF-e i za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a provjera sukladnosti uzoraka bez fracioniranja zahtijeva odgovarajuće *cut-off* vrijednosti pri biološkim testovima za PCDD/PCDF-e. Za provjeru uzoraka koji prekoračuju pragove za pokretanje postupka kao *cut-off* vrijednost prikladno je upotrebljavati odgovarajuću postotak praga za pokretanje postupka.

Ako je okvirna vrijednost izražena u BEQ, rezultati uzorka moraju biti u radnom području i prelaziti prag izvješćivanja (vidjeti točke 7.1.1. i 7.1.6.)

7.1. Procjena odziva na ispitivanje

7.1.1. Opći zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracijske krivulje TCDD-a, vrijednosti na gornjem kraju krivulje pokazuju velike varijacije (visok koeficijent varijacije (CV)). Radno područje je područje u kojem je CV manji od 15 %. Donji dio radnog područja (prag izvješćivanja) utvrđuje se na razini najmanje tri puta višoj od

▼ **M9**

slijepih uzoraka metode. Gornji dio radnog područja obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70 % najveće učinkovite koncentracije), ali je niži ako je CV u tom području veći od 15 %. Radno područje se određuje tijekom validacije. *Cut-off* vrijednosti (vidjeti točku 7.3.) moraju biti unutar radnog područja.

- Standardne otopine i ekstrakti uzoraka ispituju se trostrukom ili barem dvostrukom analizom. Kad se upotrebljavaju dvostruke analize, standardna otopina ili kontrolni ekstrakt ispitan u četiri do šest jažica raspoređenih na pločici proizvodi odziv ili koncentraciju (moгуće samo u radnom području) na temelju CV < 15 %.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivuljom

- Količine u uzorcima procjenjuju se usporedbom odziva na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD-a (ili PCB-a 126 ili standardne smjese PCDD/PCDF-a/dioksinima sličnih PCB-a) za izračun BEQ vrijednosti u ekstraktu i zatim u uzorku.

- Kalibracijske krivulje sadrжavaju od 8 do 12 koncentracija (barem za dvostruku analizu) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krivulje (radno područje). Treba obratiti posebnu pažnju na kvalitetu prilagodbe krivulje u radnom području. Vrijednost R² kao takva ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagodbe pri nelinearnoj regresiji. Bolja prilagodba postiže se smanjenjem razlike između izračunanih i opaženih vrijednosti u radnom području krivulje, npr. smanjenjem zbroja kvadrata ostataka.

- Procijenjena vrijednost u ekstraktu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunanu za slijepi uzorak matrice ili otapala (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih otapala i kemikalija), i za očito iskorištenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim profilima kongenera u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju za iskorištenje, očito iskorištenje mora biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti točku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju za iskorištenje moraju biti u skladu sa zahtjevima iz točke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

Druga je mogućnost da se upotrijebi kalibracijska krivulja pripremljena od barem četiri referentna uzorka (vidjeti točku 7.2.4.): može se koristiti jedna slijepa matrica i tri referentna uzorka na razini jednakoј 0,5 x, 1 x i 2 x najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, čime se uklanja potreba za korekcijom za slijepe vrijednosti i iskorištenje ako svojstva matrice referentnih uzoraka odgovaraju svojstvima matrice nepoznatih uzoraka. U tom se slučaju odziv na ispitivanje koji odgovara dvije trećine najveće dopuštene količine (vidjeti točku 7.3.) može izračunati izravno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao *cut-off* vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prekoračuju pragove za pokretanje postupka, kao *cut-off* vrijednost prikladno je upotrebljavati odgovarajući postotak tih pragova za pokretanje postupka.

▼ **M9****7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a**

Ekstrakti se mogu podijeliti u frakcije koje sadržavaju PCDD/PCDF-e i dioksinima slične PCB-e, što omogućuje odvojeno iskazivanje TEQ vrijednosti za PCDD/PCDF-e i dioksinima slične PCB-e (u BEQ). Za procjenu rezultata za frakciju koja sadržava dioksinima slične PCB-e po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja za PCB 126.

7.1.4. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

„Očito iskorištenje pri biološkim testovima” izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim profilima kongenera u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u usporedbi s TEQ vrijednošću. Ovisno o vrsti ispitivanja i upotrijebljenim TEF vrijednostima ⁽¹²⁾, razlike između faktora TEF i REP za dioksinima slične PCB-e mogu prouzročiti mala očita iskorištenja za dioksinima slične PCB-e u usporedbi s PCDD/PCDF-ima. Stoga, ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a, očita iskorištenja pri biološkim testovima iznosa: za dioksinima slične PCB-e 20–60 %, za PCDD/PCDF-e 50–130 % (rasponi vrijede za kalibracijsku krivulju TCDD-a). S obzirom na to da doprinos dioksinima sličnih PCB-a zbroju PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očita iskorištenja pri biološkim testovima za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a odražavaju te raspone i trebaju iznositi od 30 % do 130 %. Svaka implikacija bitnih izmjena TEF vrijednosti za zakonodavstvo Unije o PCDD/PCDF-ima i dioksinima sličnim PCB-ima zahtijeva izmjenu tih raspona.

7.1.5. Kontrola iskorištenja za pročišćavanje

Gubitak spojeva tijekom pročišćavanja provjerava se tijekom validacije. Slijepi uzorak obogaćen smjesom različitih kongenera podvrgava se pročišćavanju (najmanje $n = 3$), nakon čega se potvrdnom metodom provjeravaju iskorištenje i varijabilnost. Iskorištenje iznosi od 60 % do 120 %, osobito za kongenere koji doprinose više od 10 % TEQ vrijednosti u različitim smjesama.

7.1.6. Prag izvješćivanja

Pri izvješćivanju o vrijednostima BEQ prag izvješćivanja određuje se iz relevantnih matrica uzorka s tipičnim profilima kongenera, ali ne iz kalibracijske krivulje standarda zbog niske preciznosti u donjem području krivulje. Moraju se uzeti u obzir učinci ekstrakcije i pročišćavanja. Prag izvješćivanja utvrđuje se na razini najmanje tri puta višoj od slijepih uzoraka metode.

7.2. Korištenje referentnih uzoraka**7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju matricu uzorka, profile kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF-e i dioksinima slične PCB-e u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.****7.2.2. U svaku seriju ispitivanja uključuje se jedna slijepa matrica ili, ako to nije moguće, jedan slijepi uzorak metode i jedan referentni uzorak na razini najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ti se uzorci ekstrahiraju i ispituju istodobno u istovjetnim uvjetima. Referentni uzorak mora pokazati vidljivo veći odziv od slijepog uzorka, čime se osigurava primjerenost ispitivanja. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju za slijepe vrijednosti i iskorištenje.**

⁽¹²⁾ Trenutačni zahtjevi temelje se na TEF-ovima objavljenima u: M. Van den Berg et al, *Toxicological Sciences*, 93(2), str. 223–241. (2006.).

▼ **M9**

7.2.3. Referentni uzorci koji se odaberu za korekciju za iskorištenje moraju biti reprezentativni za testne uzorke, što znači da profili kongenera ne smiju uzrokovati preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Mogu se uključiti dodatni referentni uzorci, npr. na razini 0,5 x i 2 x najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka radi dokazivanja primjerene učinkovitosti ispitivanja u području od interesa za kontrolu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ti se uzorci mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u testnim uzorcima (vidjeti točku 7.1.2.2.).

7.3. *Određivanje cut-off vrijednosti*

Mora se utvrditi odnos između bioanalitičkih rezultata izraženih u BEQ i rezultata iz potvrdne metode izraženih u TEQ, npr. kalibracijskim pokusima u matrici s referentnim uzorcima obogaćenima na razini 0, 0,5 x, 1 x i 2 x najveće dopuštene količine, uz šest ponavljanja na svakoj razini (n = 24). Faktori korekcije (slijepe vrijednosti i iskorištenje) mogu se procijeniti iz tog odnosa, ali se moraju provjeriti u skladu s točkom 7.2.2.

Cut-off vrijednosti određuju se za odlučivanje o sukladnosti uzorka s najvećim dopuštenim količinama ili za kontrolu pragova za pokretanje postupka, ako je relevantno, pri čemu se najveće dopuštene količine ili prag za pokretanje postupka određuju posebno za PCDD/PCDF-e i za dioksinima slične PCB-e ili za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a. Predstavljaju *donju* krajnju točku distribucije bioanalitičkih rezultata (korigiranih za slijepe vrijednosti i za iskorištenje), koja odgovara granici odlučivanja potvrdne metode na temelju razine pouzdanosti od 95 %, što podrazumijeva udio lažno sukladnih rezultata < 5 %, i na temelju $RSD_R < 25$ %. Granica odlučivanja potvrdne metode najveća je dopuštena količina uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost.

Cut-off vrijednost (u BEQ) može se izračunati u skladu s jednim od pristupa navedenih u točkama 7.3.1., 7.3.2. i 7.3.3. (vidjeti sliku 1).

7.3.1. Korištenje *donjeg* raspona intervala predviđanja od 95 % na granici odlučivanja potvrdne metode

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f = m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_I - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pri čemu je:

BEQ_{DL} BEQ koji odgovara granici odlučivanja potvrdne metode, koja je najveća dopuštena količina uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost

$s_{y,x}$ rezidualna standardna devijacija

$t_{\alpha, f = m-2}$ studentov faktor ($\alpha = 5$ %, $f =$ stupnjevi slobode, jednostrani)

m ukupan broj kalibracijskih točaka (indeks j)

n broj ponavljanja na svakoj razini

x_i koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske točke i utvrđena potvrdnom metodom

$\bar{x}$ srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibracijskih uzoraka

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ parametar zbroja kvadrata, $i =$ indeks za kalibracijsku točku i

▼ M9

- 7.3.2. Izračun iz bioanalitičkih rezultata (korigirani za slijepe vrijednosti i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na granici odlučivanja potvrđne metode, kao *donja* krajnja točka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pri čemu je:

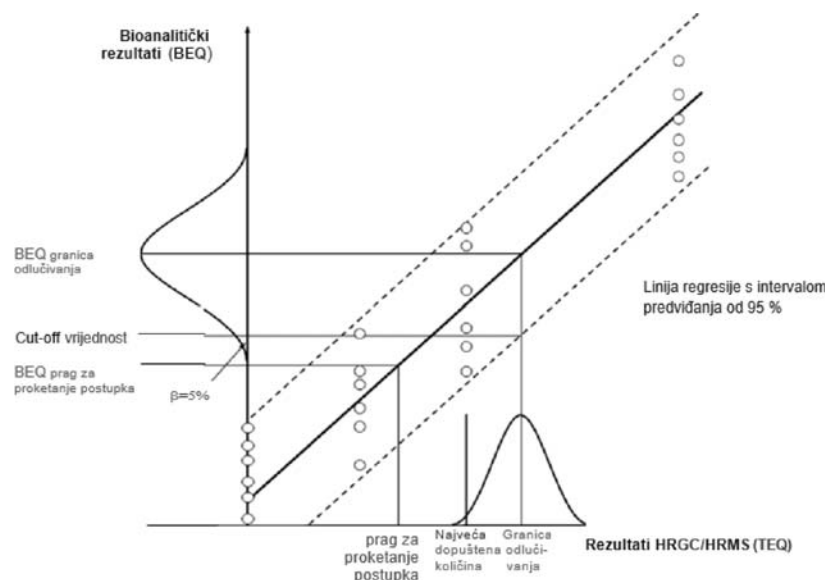
SD_R standardna devijacija rezultata bioloških testova pri BEQ_{DL} , izmjereno u uvjetima unutarlaboratorijske obnovljivosti.

- 7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigirani za slijepe vrijednosti i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na razini dvije trećine najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, na temelju opažanja da će ta vrijednost biti približna *cut-off* vrijednosti utvrđenoj u točkama 7.3.1. ili 7.3.2.:

Izračun *cut-off* vrijednosti na temelju razine pouzdanosti od 95 %, što podrazumijeva udio lažno sukladnih rezultata $< 5 \%$, i na temelju $\text{RSD}_R < 25 \%$:

1. iz *donjeg* raspona intervala predviđanja od 95 % na granici odlučivanja potvrđne metode;
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na granici odlučivanja potvrđne metode kao *donja* krajnja točka distribucije podataka (na slici 1 prikazana krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

Slika 1



- 7.3.4. Ograničenja *cut-off* vrijednosti

Cut-off vrijednosti na temelju BEQ izračunane iz RSD_R i postignute tijekom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim profilima matrica/kongenera mogu biti veće od najvećih dopuštenih količina ili pragova za pokretanje postupka na temelju TEQ zbog veće preciznosti od one koja se rutinski dobiva kada je potrebno kontrolirati nepoznat spektar mogućih profila kongenera. U takvim se slučajevima *cut-off* vrijednosti izračunavaju iz $\text{RSD}_R = 25 \%$ ili se, po mogućnosti, utvrđuju na dvije trećine najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

▼ **M9**7.4. *Karakteristike učinkovitosti*

- 7.4.1. S obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti interni standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti bioanalitičkih metoda kako bi se dobile informacije o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20 %, a unutarlaboratorijska obnovljivost manja od 25 %. To se temelji na izračunanim vrijednostima u BEQ nakon korekcije za slijepe vrijednosti i iskorištenje.
- 7.4.2. U postupku validacije mora se dokazati da se u ispitivanju razlikuju slijepi uzorak i količina jednaka *cut-off* vrijednosti kako bi se mogli identificirati uzorci iznad odgovarajuće *cut-off* vrijednosti (vidjeti točku 7.1.2.).
- 7.4.3. Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive slijepe vrijednosti.
- 7.4.4. Postotak standardne devijacije u odzivu ili koncentraciji izračunanoj iz odziva (moguće samo u radnom području) pri trostrukom određivanju ekstrakta uzorka ne smije biti iznad 15 %.
- 7.4.5. Za ocjenu učinkovitosti bioanalitičke metode kroz konstantno vremensko razdoblje koriste se nekorrigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (slijepa vrijednost i najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka).
- 7.4.6. Za slijepe uzorke metode i svaku vrstu referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju dijagrami kontrole kvalitete kako bi se osiguralo da je učinkovitost analiza u skladu sa zahtjevima, posebno za slijepe uzorke metode u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog područja i za referentne uzorke u pogledu unutarlaboratorijske obnovljivosti. Slijepi uzorci metode moraju se kontrolirati na način da se izbjegnu lažno sukladni rezultati kada se oduzimaju.
- 7.4.7. Moraju se prikupiti rezultati iz potvrdnih metoda za sumnjive uzorke i od 2 % do 10 % sukladnih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) i upotrijebiti za procjenu učinkovitosti orijentacijske metode i odnosa između BEQ i TEQ vrijednosti. Ta baza podataka može se koristiti za ponovnu ocjenu *cut-off* vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.
- 7.4.8. Učinkovitost metode može se dokazati i sudjelovanjem u međulaboratorijskim ispitivanjima. Rezultati iz uzoraka analiziranih u međulaboratorijskim ispitivanjima, koji obuhvaćaju raspon koncentracija do npr. 2 x najveće dopuštene količine mogu se uključiti u ocjenu udjela lažno sukladnih rezultata ako laboratorij može dokazati učinkovitost. Uzorci moraju uključivati najčešće profile kongenera iz različitih izvora.
- 7.4.9. U slučaju incidenata *cut-off* vrijednosti mogu se ponovo ocijeniti uzimajući u obzir profile matrica i kongenera dotičnog incidenta.

8. **Izvjешćivanje o rezultatima**8.1. *Potvrđne metode*

- 8.1.1. Rezultati analize moraju sadržavati količine pojedinačnih kongenera PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a, a TEQ vrijednosti se moraju navesti kao donje granice, gornje granice ili srednje granice kako bi se u izvješća o rezultatima uključila maksimalna količina podataka i tako omogućilo tumačenje rezultata u skladu s posebnim zahtjevima.

▼ **M9**

- 8.1.2. U izvješću treba navesti metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.
- 8.1.3. Iskorištenja pojedinih internih standarda navode se ako su izvan raspona navedenog u točki 6.2.5. u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene količine (u tom se slučaju navode iskorištenja za jednu od dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.
- 8.1.4. S obzirom na to da pri odlučivanju o sukladnosti uzorka treba uzeti u obzir proširenu mjernu nesigurnost, taj se parametar mora navesti. Rezultati analize prikazuju se kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U proširena mjerna nesigurnost uz faktor pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %. U slučaju kada se PCDD/PCDF-i i dioksinima slični PCB-i određuju odvojeno, zbroj procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analize PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a koristi se za zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.
- 8.1.5. Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i s najmanje istim brojem značajnih znamenki kao najveće dopuštene količine utvrđene u Direktivi 2002/32/EZ.
- 8.2. *Bioanalitičke orijentacijske metode*
- 8.2.1. Rezultat orijentacijske metode izražava se kao „sukladan” ili kao „rezultat za koji se sumnja da je nesukladan” („sumnjiv”).
- 8.2.2. Osim toga, može se navesti okvirni rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili dioksinima slične PCB-e izražen u BEQ, a ne TEQ vrijednosti.
- 8.2.3. Za uzorke s odzivom ispod granice izvješćivanja navodi se da su „ispod granice izvješćivanja”. Za uzorke s odzivom iznad radnog područja navodi se da „prelaze radno područje”, a količina koja odgovara gornjem dijelu radnog područja navodi se u BEQ vrijednosti.
- 8.2.4. Za svaku vrstu matrice uzorka u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojem se temelji procjena.
- 8.2.5. U izvješću se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.
- 8.2.6. U izvješću treba navesti metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.
- 8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu sukladni, izvješće treba sadržavati napomenu o mjerama koje treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.
- 8.2.8. Nesukladni rezultati navode se samo iz potvrdne analize.
- 8.3. *Fizikalno-kemijske orijentacijske metode*
- 8.3.1. Rezultat orijentacijske metode izražava se kao „sukladan” ili kao „rezultat za koji se sumnja da je nesukladan” („sumnjiv”).
- 8.3.2. Za svaku vrstu matrice uzorka u izvješću se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojem se temelji procjena.

▼ **M9**

- 8.3.3. Osim toga, mogu se navesti količine pojedinačnih kongenera PCDD/PCDF-a i/ili dioksinima sličnih PCB-a, te se mogu navesti TEQ vrijednosti kao donje granice, gornje granice i srednje granice. Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i s najmanje istim brojem značajnih znamenki kao najveće dopuštene količine utvrđene u Direktivi 2002/32/EZ.
- 8.3.4. Iskorištenja pojedinih internih standarda navode se ako su izvan raspona navedenog u točki 6.2.5. u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene količine (u tom se slučaju navode iskorištenja za jednu od dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.
- 8.3.5. U izvješću se navodi primijenjena GC-MS metoda.
- 8.3.6. U izvješću treba navesti metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a.
- 8.3.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu sukladni, izvješće treba sadržavati napomenu o mjerama koje treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a u tim uzorcima s povišenim razinama mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.
- 8.3.8. O nesukladnosti se može odlučiti samo nakon potvrdne analize.

POGLAVLJE III.

Priprema uzorka i zahtjevi za analitičke metode koje se koriste za službenu kontrolu količina PCB-a koji nisu slični dioksinima u hrani za životinje**1. Područje primjene**

Zahtjevi iz ovog poglavlja primjenjuju se kad se hrana za životinje analizira za službenu kontrolu količina PCB-a koji nisu slični dioksinima i u pogledu pripreme uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorne svrhe, uključujući kontrole koje provodi subjekt u poslovanju s hranom za životinje za osiguravanje sukladnosti s odredbama Uredbe (EZ) br. 183/2005.

2. Metode detekcije koje se koriste

Plinska kromatografija/detektor apsorpcije elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrđivanje analita od interesa

- 3.1. Relativno vrijeme retencije u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Plinsko-kromatografsko odvajanje PCB-a koji nisu slični dioksinima od interferirajućih tvari, posebno PCB-a koji koeluiraju, a naročito ako su vrijednosti uzoraka u rasponu zakonski dozvoljenih granica i nesukladnost se mora potvrditi ⁽¹³⁾.
- 3.3. Zahtjevi za GC-MS tehnike

Praćenje najmanje sljedećeg broja molekulskih iona ili karakterističnih iona iz molekulskog klastera:

(a) dva specifična iona za HRMS;

(b) tri specifična iona za LRMS;

⁽¹³⁾ Kongeneri za koje je često utvrđeno da koeluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS uzimaju se u obzir i moguće interferencije fragmenata kongenera koji su više klorirani.

▼ **M9**

- (c) dva specifična iona prekursora, svaki s jednim odgovarajućim prijelaznim produktom ionom za MS-MS.

Najveća dopuštena odstupanja za omjere zastupljenosti odabranih fragmenata mase:

Relativna devijacija omjera zastupljenosti odabranih fragmenata mase u odnosu na teoretsku zastupljenost ili kalibracijski standard za ciljani ion (najzastupljeniji praćeni ion) i kvalifikacijski ion: $\pm 15 \%$.

3.4. Zahtjevi za tehnike GC-ECD

Rezultati koji prelaze najveću dopuštenu količinu potvrđuju se s dvije GC kolone sa stacionarnim fazama različite polarnosti.

4. Dokazivanje učinkovitosti metode

Učinkovitost metode mora se validirati u rasponu najveće dopuštene količine (0,5 do 2 puta najveće dopuštene količine) s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za intermedijarnu preciznost u točki 9.).

5. Granica kvantifikacije

Zbroj granica kvantifikacije (LOQ) ⁽¹⁴⁾ PCB-a koji nisu slični dioksinima ne smije biti veći od jedne trećine najveće dopuštene količine ⁽¹⁵⁾.

6. Kontrola kvalitete

Redovite provjere sa slijepim probama, analiza obogaćenih uzoraka, uzorci za kontrolu kvalitete, sudjelovanje u međulaboratorijskim studijama s relevantnim matricama.

7. Kontrola iskorištenja

- 7.1. Moraju se koristiti primjereni interni standardi s fizikalno-kemijskim svojstvima usporedivima s analitima od interesa.

- 7.2. Dodavanje internih standarda:

Dodavanje proizvoda (prije ekstrakcije i postupka pročišćavanja).

- 7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest izotopom obilježenih kongenera PCB-a koji nisu slični dioksinima:

- (a) rezultati se korigiraju za iskorištenje internih standarda;
- (b) iskorištenje internih standarda obilježenih izotopom mora biti između 60 i 120 %;
- (c) prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s doprinosom zbroju PCB-a koji nisu slični dioksinima manjim od 10 %.

- 7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopom obilježenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:

- (a) iskorištenje internih standarda kontrolira se za svaki uzorak;
- (b) iskorištenje internih standarda mora biti između 60 i 120 %;
- (c) rezultati se korigiraju za iskorištenje internih standarda.

⁽¹⁴⁾ Načela opisana u smjernicama *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food* [<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>] poštuju se ako su primjenjiva.

⁽¹⁵⁾ Preporučljivo je da doprinos vrijednosti slijepog uzorka s reagensom količini kontaminanta u uzorku bude niži. Laboratorij je obavezan kontrolirati promjene slijepih vrijednosti, posebno ako se slijepe vrijednosti oduzimaju.

▼ **M9**

- 7.5. Iskorištenje neobilježenih kongenera provjerava se obogaćenim uzorcima ili uzorcima za kontrolu kvalitete s koncentracijama u rasponu najveće dopuštene količine. Iskorištenje za te kongenere smatra se prihvatljivim ako je između 60 i 120 %.

8. **Zahtjevi za laboratorije**

U skladu s odredbama Uredbe (EU) 2017/625, laboratorije akreditira priznato tijelo koje djeluje u skladu s uputama ISO/IEC Guide 58 kako bi se osiguralo da primjenjuju postupke osiguravanja kvalitete analitičkih postupaka. Laboratoriji se akreditiraju u skladu s normom EN ISO/IEC 17025. Osim toga, moraju se poštovati načela opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCB-a ⁽¹⁶⁾.

9. **Karakteristike učinkovitosti: kriteriji za zbroj PCB-a koji nisu slični dioksinima pri najvećoj dopuštenoj količini**

	Masena spektrometrija s izotopnim razrjeđenjem (*)	Ostale tehnike
Istinitost	–20 do +20 %	–30 do +30 %
Intermedijarna preciznost (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Razlika između izračuna gornje granice i donje granice	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Treba upotrijebiti svih šest analoga obilježenih izotopom ¹³C kao interne standarde.

10. **Izvjешćivanje o rezultatima**

- 10.1. Rezultati analize moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB-a koji nisu slični dioksinima i zbroj kongenera tih PCB-a, navedene kao donje vrijednosti, gornje vrijednosti i srednje vrijednosti, kako bi se u izvješće o rezultatima uključilo što više informacija o rezultatima i tako omogućilo tumačenje rezultata u skladu s posebnim zahtjevima.
- 10.2. U izvješću se navodi metoda korištena za ekstrakciju PCB-a.
- 10.3. Iskorištenja pojedinih internih standarda navode se ako su izvan raspona navedenog u točki 7. u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene količine, a u drugim slučajevima na zahtjev.
- 10.4. S obzirom na to da proširenu mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odlučivanju o sukladnosti uzorka, treba navesti i taj parametar. Rezultati analize prikazuju se kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U proširena mjerna nesigurnost uz faktor pokrivanja 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95 %.
- 10.5. Rezultati se izražavaju u istim jedinicama i s najmanje istim brojem značajnih znamenki kao najveće dopuštene količine utvrđene u Direktivi 2002/32/EZ.

B. EN NORME

Za primjenu članka 34. stavka 2. točke (a) Uredbe (EU) 2017/625 relevantne su sljedeće EN norme:

⁽¹⁶⁾ Vidjeti bilješku 9.

▼ **M9**

EN 17194: Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje deoksinivalenola, aflatoksina B1, fumonisina B1 & B2, T-2 & HT-2 toksina, zearalenona i ohratoksina A u krmivima i krmnim smjesama metodom LC-MS/MS

EN 17270: Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje teobromina u krmivima i krmnim smjesama, uključujući sastojke dobivene iz kakaa, tekućinskom kromatografijom

EN 17504 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje gosipola u pamukovom zrnu i hrani za životinje s LC-MS/MS

EN 17362 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje pentaklorofenola (PCP) u krmivima i krmnim smjesama metodom LC-MS/MS

EN 16279: Hrana za životinje – Određivanje sadržaja fluorida, nakon obrade klorovodičnom kiselinom, metodom ionsko-selektivne elektrode (ISE)

EN 17053: Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje elemenata u tragovima, teških metala i ostalih elemenata u hrani metodom ICP-MS (multimetoda)

EN 15550 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kadmija i olova atomskom apsorpcijskom spektrometrijom s grafitnom peći (GF-AAS) nakon razgradnje pod tlakom

EN 16206 Hrana za životinje – Određivanje arsena atomskom apsorpcijskom spektrometrijom hidridni postupak (HGAAS) nakon mikrovalne tlačne razgradnje (razgradnja sa 65 % dušičnom kiselinom i 30 % vodikovim peroksidom)

EN 16277 Hrana za životinje – Određivanje žive atomskom apsorpcijskom spektrometrijom, tehnikom hladne pare (CVAAS), nakon mikrovalne razgradnje pod tlakom (ekstrakcija sa 65 %-tnom dušičnom kiselinom i 30 %-tnim vodikovim peroksidom)

EN 16278 Hrana za životinje – Određivanje anorganskog arsena hidridnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije (HG-AAS), nakon mikrovalne ekstrakcije i razdvajanja ekstrakcijom na čvrstom nosaču (SPE)

EN 17374 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje anorganskog arsena u hrani za životinje primjenom anionskog izmjenjivača HPLC-ICP-MS

▼ **M2***PRILOG VI.***METODE ANALIZE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG
PODRIJETLA ZA SLUŽBENU KONTROLU HRANE ZA ŽIVOTINJE**▼ **M8****1. SVRHA I OPSEG**

Određivanje sastojaka životinjskog podrijetla u hrani za životinje provodi se svjetlosnom mikroskopijom ili lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u skladu s odredbama iz ovog Priloga.

Ove dvije metode omogućuju detekciju prisutnosti sastojaka životinjskog podrijetla u premiksima, krmivima i krmnim smjesama. Međutim, one ne omogućavaju izračun količine takvih sastojaka u premiksima, krmivima i krmnim smjesama. Obje metode imaju granicu detekcije ispod 0,1 % (m/m).

PCR metoda omogućuje određivanje taksonomske skupine sastojaka životinjskog podrijetla prisutnih u premiksima, krmivima i krmnim smjesama.

Te metode primjenjuju se pri kontroli provedbe zabrana iz članka 7. stavka 1. Uredbe (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾, i Priloga IV. toj uredbi te iz članka 11. stavka 1. Uredbe (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽²⁾.

Ovisno o vrsti hrane za životinje koja se ispituje, te metode mogu se koristiti u okviru jednog jedinstvenog operativnog protokola bilo samostalno ili zajedno u skladu sa standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama ⁽³⁾.

▼ **M2****2. METODE**▼ **M8****2.1. Svjetlosna mikroskopija****2.1.1. Načelo**

Sastojci životinjskog podrijetla koji mogu biti prisutni u premiksima, krmivima i krmnim smjesama poslanima na analizu identificiraju se na temelju tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika kao što su mišićna vlakna i ostale čestice mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinja, kutikularni fragmenti beskralješnjaka, trahealne strukture kukaca, krv, kapljice mlijeka, kristali laktoze, perje, ljuške jaja, riblje kosti i krljušt.

⁽¹⁾ Uredba (EZ) br. 999/2001 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. svibnja 2001. o utvrđivanju pravila za sprečavanje, kontrolu i iskorjenjivanje određenih transmisivnih spongiformnih encefalopatija (SL L 147, 31.5.2001., str. 1.).

⁽²⁾ Uredba (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009. o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi te o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1774/2002 (Uredba o nusproizvodima životinjskog podrijetla) (SL L 300, 14.11.2009., str. 1.).

⁽³⁾ <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

▼M8

Mikroskopska ispitivanja provode se nakon pripreme uzoraka sedimentacijom.

Uzorci se podvrgavaju postupku sedimentacije na sljedeći način:

- (a) za detekciju sastojaka životinjskog podrijetla osim od kopnenih beskralješnjaka, postupak jednostruke sedimentacije tetrakloretilenom (TCE) kako je navedeno u točki 2.1.3.4.3.;
- (b) za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka, postupak dvostruke sedimentacije petroleterom/tetrakloretilenom (PE/TCE), kako je opisano u točki 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reagensi i oprema*

2.1.2.1. Reagensi

2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentriranje

- Tetrakloretilen (specifična težina 1,62).
- Vrelište petroletera (PE) 40–60 °C (specifična težina 0,65).

2.1.2.1.2. Reagens za bojenje

- Alizarin crvenilo (otopi se 2,5 ml 1M kloridne kiseline u 100 ml vode i toj se otopini doda 200 mg alizarin crvenila).

2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata

- Lužina (NaOH 2,5 % w/v ili KOH 2,5 % w/v)
- Glicerol (nerazrijeđen, viskoznost: 1 490 cP) ili sredstvo za pripremu preparata s ekvivalentnim svojstvima za pripremu privremenih preparata
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoznost: 1 200 cP) ili smola s istovjetnim svojstvima za pripremu trajnih preparata.

2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja

- Lugolova otopina (otopi se 2 g kalijevog jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda)
- Cistinski reagens (2 g olovnog acetata, 10 g NaOH/100 ml vode)
- Fehlingov reagens (priprema se prije upotrebe od dijelova temeljnih otopina A i B u omjeru 1:1: otopina A (otopi se 6,9 g bakrova (II) sulfata pentahidrata u 100 ml vode): otopina B (otopi se 34,6 g kalijeva natrijeva tartarat tetrahidrata i 12 g NaOH u 100 ml vode).
- Tetrametilbenzidin/vodikov peroksid (otopi se 1 g 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml ledene octene kiseline i 150 ml vode. Prije uporabe pomiješa se otopina TMB-a s 3 %-tnim vodikovim peroksidom u omjeru 4:1.

2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje

- Etanol ≥ 96 % (tehnički čist).
- Aceton (tehnički čist).

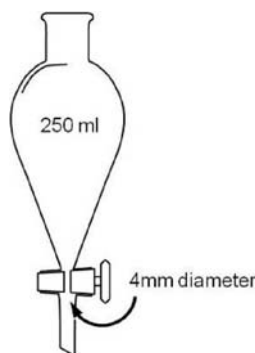
2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje

- Komercijalna otopina natrijevog hipoklorita (9 – 14 % aktivnog klora).

▼ **M8**

2.1.2.2. Oprema

- Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g.
- Pribor za mljevenje: nož ili mlin s rotorom. Ako se koristi mlin s rotorom zabranjena je upotreba mlinskih sita $\leq 0,5$ mm
- Sita s mrežicom kvadratnih očica širine 0,25 mm i 1 mm. Osim kod prethodnog prosijavanja uzorka, promjer sita ne smije biti veći od 10 cm kako bi se izbjegao gubitak materijala. Kalibracija sita nije potrebna.
- Konusni stakleni lijevak za odjeljivanje zapremine 250 ml s teflonskim čepom ili čepom od brušenog stakla na dnu konusa. Promjer otvora čepa mora biti ≥ 4 mm. Umjesto toga, samo za jednostruku sedimentaciju TCE-om, može se upotrijebiti čaša s konusnim dnom za sedimentaciju pod uvjetom da je laboratorij dokazao da su granice detekcije ekvivalentne onima koje se dobiju kada se koristi konusni stakleni lijevak za odjeljivanje.

*Promjer 4 mm*

- Stereomikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od $6,5\times$ do $40\times$.
- Sastavljeni mikroskop koji obuhvaća barem konačni opseg povećanja od $100\times$ do $400\times$ s poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizirano svjetlo, diferencijalni interferentni kontrast.
- Standardno laboratorijsko posuđe od stakla.
- Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska stakalca, stakalca s udubinom, pokrovna stakalca (20×20 mm), pinceta, fina lopatica.
- Laboratorijska peć.
- Centrifuga.
- Filtar papir: kvalitativni celulozni filtar (veličine pora 4–11 μm).

2.1.3. *Uzorkovanje i priprema uzorka*

2.1.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak uzet u skladu Prilogom I.

▼M8

2.1.3.1.1 Sušenje uzoraka

Uzorci sa sadržajem vlage > 14 % moraju se osušiti prije rukovanja u skladu s Prilogom III.

2.1.3.1.2 Prethodno prosijavanje uzorka:

Kako bi se prikupile informacije o mogućem okolišnom zagađenju hrane za životinje, preporučuje se da se hrana u peletima i zrnu prethodno prosije na 1 mm i da se dvije dobivene frakcije, koje se moraju smatrati različitim uzorcima, zatim odvojeno pripreme i analiziraju te da se o njima odvojeno izvijesti.

2.1.3.2. Mjere opreza

Kako bi se spriječila križna kontaminacija u laboratoriju, svu laboratorijsku opremu za višekratnu uporabu potrebno je pažljivo očistiti prije uporabe. Dijelove lijevka za odjeljivanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Dijelove lijevka za odjeljivanje i posude od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u perilici posuđa. Sita se moraju očistiti četkom s tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporuča se završno čišćenje sita acetonom i komprimiranim zrakom nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

2.1.3.3. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja

Potrebno je slijediti sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti:

- ako je mast u krutom stanju, zagrijava se u pećnici, dok ne postane tekuća.
- Koristeći pipetu prenese se 40 ml masti ili ulja s dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje.
- Uzorak se centrifugira 10 minuta na 4 000 okr/min.
- Ako je mast nakon centrifugiranja u krutom stanju, zagrijava se u pećnici dok ne postane tekuća.
- Ponovo se centrifugira 5 minuta pri 4 000 okr/min.
- Žličicom ili spatulom prenese se polovica dekantirane nečistoće na mikroskopsko stakalce radi pregleda. Kao sredstvo za pripremu preparata preporuča se glicerol.
- Preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u točki 2.1.3.4.3., prvoj alineji.

Isti postupak, osim prve i četvrte alineje, primjenjuje se za pripremu uzoraka koji se sastoje od ulja.

2.1.3.4. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.4.1. Razdioba uzorka u poduzroke i mljevenje: barem 50 g uzorka razdijeli se na poduzorke za analizu koji se zatim melju.

2.1.3.4.2. Priprema sirovine: pripremi se dio od najmanje 5 g samljevenog poduzorka. Prosijava se na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

▼ **M8**

- 2.1.3.4.3. Jednostruka sedimentacija TCE-om za detekciju sastojaka životinjskog podrijetla osim kopnenih beskralješnjaka.

— Ekstrakcija i priprema taloga:

Prenese se dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odjeljivanje ili čašu s konusnim dnom za sedimentaciju i doda se 50 ml TCE-a. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3 g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog podrijetla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10 % taloga. Mješavinu je potrebno snažno protresti tijekom najmanje 30 s i mora se oprezno dodati još 50 ml TCE-a kako bi se isprale unutarnje stijenke lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobivena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem čepa.

Ako se koristi čaša s konusnim dnom za sedimentaciju, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prijanjajuće čestice uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog TCE-a. Mješavina treba odstajati 3 minute i zatim ponovo promiješati 15 sekundi, a sve čestice koje prijanjaju uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutarnju površinu s najmanje 10 ml čistog TCE-a. Tako dobivena mješavina treba odstajati najmanje 5 minuta, zatim se tekuća frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se niti malo taloga ne izgubi.

Talog se prikuplja na filter papiru koji se stavlja u lijevak kako bi se omogućilo odvajanje preostalog trikloretilena (TCE) i pritom izbjeglo nakupljanje masti u talogu. Talog se zatim suši. Preporučuje se da se talog zatim izvaže (s preciznošću od 0,001 g) u svrhu kontrole faze sedimentacija. Konačno, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim, talog se prosijava na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

— Ekstrakcija i priprema flotata:

Nakon dobivanja taloga gore opisanom metodom, u lijevku za odjeljivanje moraju ostati dvije faze: tekuća koja se sastoji od TCE-a i kruta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta kruta faza je flotat koji se izolira tako da se TCE u cijelosti odlije iz lijevka otvaranjem čepa. Okretanjem lijevka za odjeljivanje, flotat se prenese u veliku Petrijevu zdjelicu i posuši na zraku u digestoru. Prosijava se na 0,25 mm te se dvije dobivene frakcije ispituju.

— Uporaba reagensa za bojanje:

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog podrijetla, subjekt može koristiti reagense za bojanje tijekom pripreme uzorka u skladu sa smjernicama koje je izdao EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

▼ **M8**

Ako se koristi otopina Alizarin crvenila za bojanje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

- Osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere s približno 5 ml etanola (svaki se put koristi vrtložna miješalica tijekom 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i 30 s i zatim odlije),
- Talog se izbijeli dodavanjem najmanje 1 ml otopine natrijevog hipoklorita. Reakcija se razvija 10 minuta. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi stajati 2 - 3 minute, a voda i suspendirane čestice se pažljivo odlije,
- Talog se dvaput ispere s 10 ml vode (koristi se vrtložna miješalica 30 s, ostavi se istaložiti i svaki se put odlije voda),
- doda se 2 - 10 kapi otopine Alizarin crvenila i smjesa se promućka u vrtložnoj miješalici. Trajanje reakcije je 30 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere s približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki se put koristi vrtložna miješalica 30 s, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i zatim odlije),
- Obojeni talog se osuši.

2.1.3.4.4. Dvostruka sedimentacija PE/TCE za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka.

Svi se koraci moraju provesti u konusnom staklenom lijevku za odjeljivanje zapremnine 250 ml kako je opisano u točki 2.1.2.2., četvrtoj alineji.

- Dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog uzorka prenese se u lijevak za odjeljivanje i najprije se podvrgava jednostrukoj sedimentaciji TCE-om kako je opisano u točki 2.1.3.4.3., uključujući dobivanje taloga na filter papiru postavljenom na lijevak. Taj se talog može upotrijebiti kao talog iz točke 2.1.3.4.3.
- Mali volumen TCE-a koji se iscijedi zajedno s talogom prenosi se u menzuru. Menzura se mora dodatno napuniti otvaranjem čepa lijevka za odjeljivanje dok se ne dobije 30 ml TCE-a. Kad se taj volumen dosegne, lijevak se začepi.
- Taj prikupljeni volumen TCE-a zamjenjuje se dodavanjem volumena od 30 ml petroletera točke vrelišta 40–60 °C u lijevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka za odjeljivanje mora se temeljito promiješati kako bi se dobila smjesa u omjeru 70 % TCE-a i 30 % PE-a (s gustoćom od približno 1,26 g.cm⁻³). Materijal bi trebao odstajati 10 minuta. Odvojiti će se dvije nove frakcije: drugi talog i konačni flotat (< 1,26 g.cm⁻³). Drugi talog izolira se u Petrijevoj zdjelici (ili na filter papiru postavljenom na lijevak) otvaranjem čepa dok u lijevku za odjeljivanje ne ostanu samo malo smjese otapala i konačni flotat. Preostala tekućina i konačni flotat prikupljaju se odvojeno na filter papiru postavljenom na lijevak. Stjenka lijevka za odjeljivanje ispiri se mlazom PE-a kako bi se sakupio sav materijal iz konačnog flotata. Konačni flotat se mora osušiti. Konačni flotat prosijava se na 0,25 mm, a dvije dobivene frakcije ispituju se radi detekcije sastojaka kopnenih beskralješnjaka, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim.

▼ **M8**2.1.4. *Mikroskopiranje*

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat priprema se od taloga i, po izboru laboranta, od flotata ili sirovine. Prema potrebi, samo za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka, priprema se i preparat od konačnog flotata dobivenog kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. Pripremaju se dvije dobivene frakcije (sitna i gruba). Pokusni dijelovi frakcija nanoseni na stakalca reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se osigurala provedba čitavog ispitnog protokola koji je određen u točki 2.1.4.2.

Mikroskopski preparati se pripremaju s odgovarajućim sredstvom za pripremu preparata u skladu sa SOP-om koji je odredio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim stakalcima.

2.1.4.2. Dijagram toka pregleda za detekciju životinjskih čestica u krmnim smjesama, krmivima i premiksima.

Pripremljeni mikroskopski preparati promatraju se u skladu s dijagramima toka pregleda propisanim u dijagramima 1. i 2.

Mikroskopski pregledi provode se koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i, po izboru laboranta, na flotatu ili na sirovini. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Osim toga, za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka opažanja se provode i na konačnom flotatu dobivenom kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. u skladu s dijagramom 3. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat pregledava se u cijelosti i pod različitim povećanjima. Precizna objašnjenja o korištenju dijagrama toka pregleda detaljno su navedena u standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je utvrdio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama.

Najmanji broj preparata koji se mora promotriti u svakoj fazi dijagrama toka pregleda mora se strogo poštovati, osim u slučajevima kada cijeli materijal frakcije ne omogućuje postizanje utvrđenog broja preparata, primjerice u slučaju nedobivanja taloga. Pri svakom određivanju upotrebljava se najviše 6 preparata za bilježenje broja čestica.

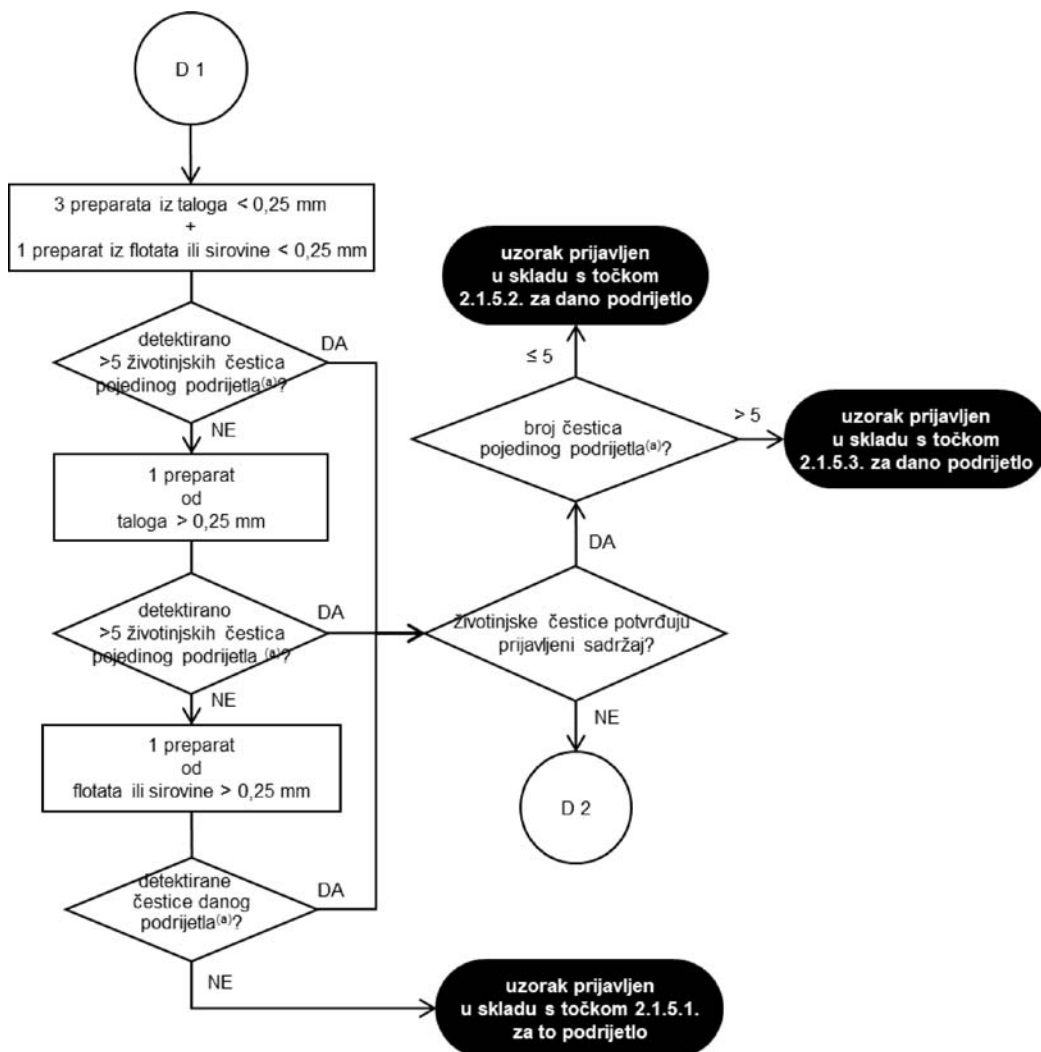
Ako se pripremaju dodatni preparati uporabom specifičnijeg sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja, kako je opisano u točki 2.1.2.1.4., na flotatu ili sirovini za daljnju karakterizaciju struktura (npr. perje, kosa, mišićne čestice ili čestice krvi), koje su detektirane na preparatima dobivenima uporabom drugih sredstava za pripremu preparata, kako je opisano u točki 2.1.2.1.3., broj čestica računa se na temelju najviše 6 preparata po određivanju, uključujući dodatne preparate sa specifičnijim sredstvom za pripremu preparata. Dodatni preparati pripremljeni od konačnog flotata dobivenog kako je opisano u točki 2.1.3.4.4. za detekciju sastojaka kopnenih beskralješnjaka ne uzimaju se u obzir za identifikaciju drugih podrijetla (kopneni kralješnjaci i ribe).

Za lakšu identifikaciju vrste i podrijetla čestica laborant može koristiti pomoćne alate kao što su sustavi za potporu pri odlučivanju, zbirke slika i referentni uzorci.

▼ **M8**

Dijagram 1.

Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih beskralješnjaka u krmnim smjesama, krmivima i premiksima za prvo određivanje

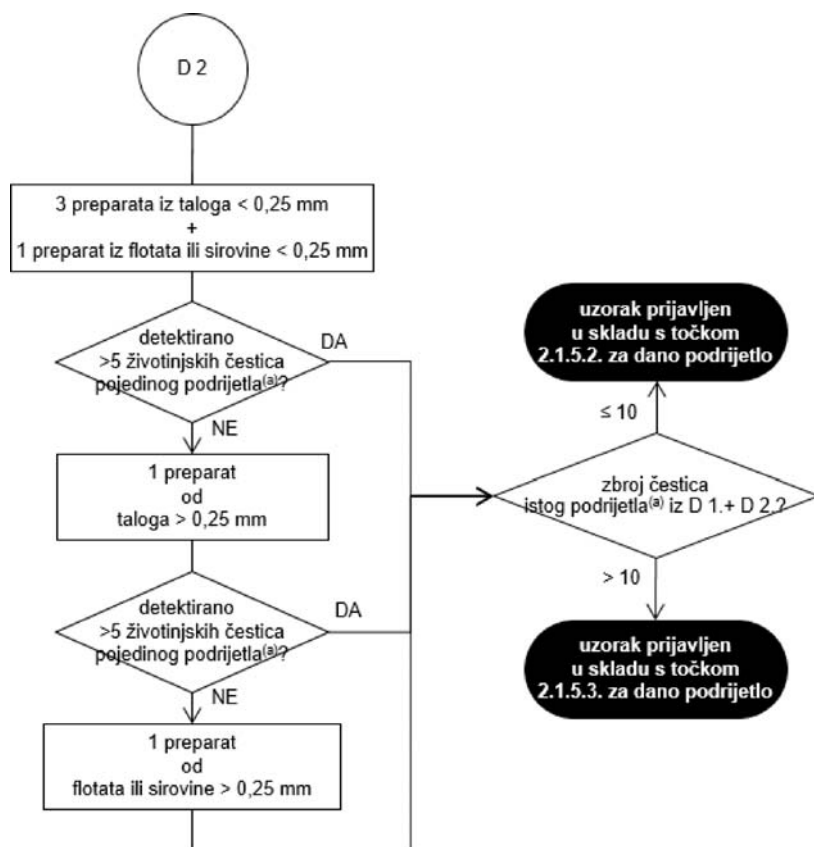


(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje; (a): kopneni kralježnjaci, ribe)

▼ **M8**

Dijagram 2.

Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih beskralješnjaka u krmnim smjesama, krmivima i premiksima za drugo određivanje

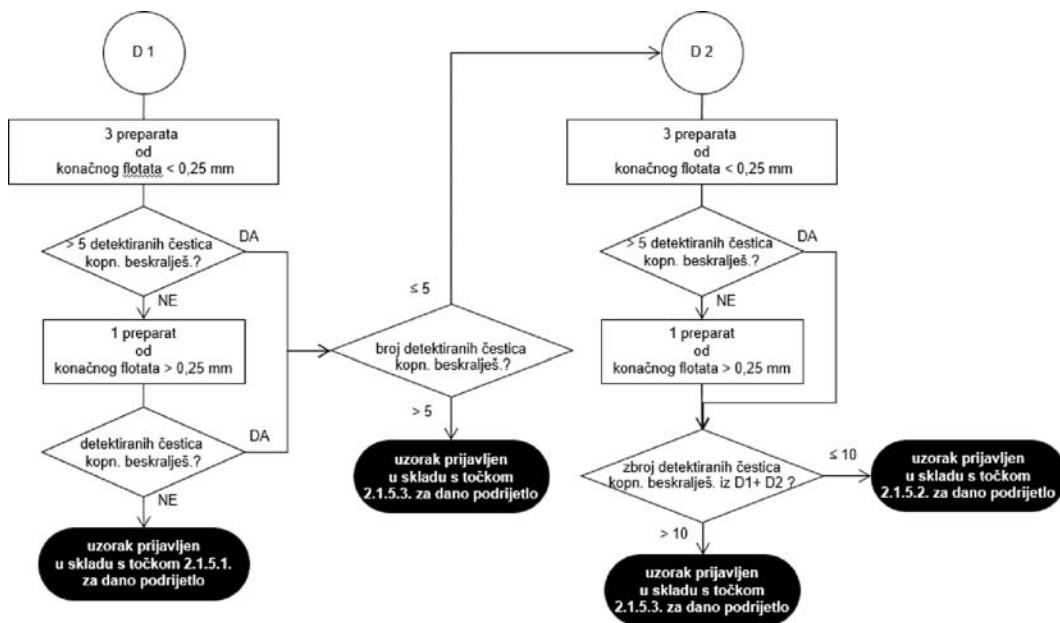


(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje; ^(a): kopneni kralježnjaci, ribe)

▼M8

Dijagram 3.

Dijagram toka pregleda nakon dvostruke sedimentacije PE/TCE-om za detekciju sastojaka kopnenih beskranješnjaka u krmnoj smjesi, krmivima i premiksima



(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje)

2.1.4.3. Broj određivanja

Određivanja se provode na različitim poduzorcima od po 50 g.

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramima 1. ili 3. nisu detektirane životinjske čestice, nije potrebno provesti dodatno određivanje, a o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.1.

Ako se nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda iz dijagrama 1. utvrdi jedna ili više životinjskih čestica danog podrijetla (tj. od kopnenih kralješnjaka ili ribe), a podrijetlo pronađenih čestica potvrđuje prijavljeni sadržaj uzorka, nije potrebno provesti drugo određivanje. Ako je broj životinjskih čestica danog podrijetla detektiranih tijekom tog prvog određivanja veći od 5, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.2.

Ako se nakon prvog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramu 3. utvrdi više od pet čestica kopnenih beskranješnjaka, nije potrebno drugo određivanje i rezultat analize za to podrijetlo prijavljuje se u skladu s formulacijom iz točke 2.1.5.3.

▼ **M8**

U drugim slučajevima, ako laboratoriju nije dostavljena deklaracija sadržaja, provodi se drugo određivanje na temelju novog poduzorka. Ako je, nakon drugog određivanja provedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramima 2. odnosno 3. zbroj životinjskih čestica danog podrijetla detektiranih u dva određivanja veći od 10, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti po životinjskom podrijetlu korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje korištenjem formulacije iz točke 2.1.5.2.

2.1.5. *Prikaz rezultata*

Pri izvješćivanju o rezultatima, laboratorij mora navesti na kojoj vrsti materijala je provedena analiza (talog, flotat, konačni flotat ili sirovina). U izvješću se jasno navodi koliko je određivanja provedeno i je li prije pripreme preparata provedeno prosijavanje frakcija u skladu s točkom 2.1.3.4.3., trećim stavkom, prvom alinejom ili točkom 2.1.3.4.4. trećom alinejom.

Laboratorijsko izvješće mora sadržavati barem informacije o prisutnosti sastojaka podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe.

O različitim slučajevima izvješćuje se na sljedeće načine.

2.1.5.1. Nije detektirana nijedna čestica danog podrijetla:

- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka.”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od ribe.”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije detektirana prisutnost čestica podrijetlom od kopnenih beskrležnjaka.”

2.1.5.2. Pri provedbi samo jednog određivanja detektirano je od 1 do 5 životinjskih čestica danog podrijetla ili pri provedbi dvaju određivanja detektirano je od 1 do 10 čestica danog podrijetla (broj detektiranih čestica manji je od praga utvrđenog u standardiziranim operativnim postupcima (SOP) koje je utvrdio referentni laboratorij EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavio na svojim internetskim stranicama):

Ako je provedeno samo jedno određivanje:

- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 5 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 5 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuške, hrskavica, mišić, otolith, škрге, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

▼ **M8**

Ako su provedena dva određivanja:

- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost najviše 10 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)]. Ta niska razina prisutnosti niža je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.”

Dodatno:

- U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) utvrđene životinjske čestice, jer detekcija životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.
- Ako se detektiraju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizirati kao čestice podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izvješću se navodi da su detektirane samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potječu od kopnenih kralješnjaka.

- 2.1.5.3. Pri provedbi samo jednog određivanja utvrđeno je više od 5 životinjskih čestica danog podrijetla ili je pri provedbi dvaju određivanja detektirano više od 10 čestica danog podrijetla:

Ako je provedeno samo jedno određivanje:

- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)].”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)].”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 5 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

▼ M8

Ako su provedena dva određivanja:

- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od kopnenih kralješnjaka. Čestice su identificirane kao ... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navedite ono što odgovara)].”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od ribe. Čestice su identificirane kao ... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge, ostalo (navedite ono što odgovara)].”
- „Koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva određivanja u dostavljenom uzorku detektirana je prisutnost više od 10 čestica podrijetlom od kopnenih beskralješnjaka. Čestice su identificirane kao... [kutikularni fragmenti, dijelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navedite ono što odgovara)].”

Dodatno:

- U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvješću mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) detektirane životinjske čestice, jer detekcija životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.
- Ako se detektiraju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizirati kao čestice podrijetlom od kopnenih kralješnjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izvješću se navodi da su otkrivene samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potječu od kopnenih kralješnjaka.

▼ M2

2.2.

PCR

2.2.1.

Načelo

Fragmenti deoksiribonukleinske kiseline (DNK) životinjskog podrijetla koji mogu biti prisutni u krmivima i krmnim smjesama otkrivaju se tehnikom genskog umnožavanja putem PCR-a koja cilja DNK sekvence značajne za vrstu.

PCR metoda zahtijeva najprije ekstrakciju DNK-a. Umnožavanje se vrši kasnije na tako dobivenom DNK ekstraktu kako bi se otkrila ciljana životinjska vrsta.

2.2.2.

Reagensi i oprema

2.2.2.1

Reagensi

2.2.2.1.1.

Reagensi za ekstrakciju DNK-a

Upotrebljavaju se samo reagensi koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

2.2.2.1.2.

Reagensi za umnožavanje genskog materijala

▼ **M2**

2.2.2.1.2.1. Početnice i sonde

Upotrebljavaju se samo početnice i sonde sa sekvencama oligonukleotida koje je validirao EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici ⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.2. Glavna mješavina (Master mix)

Upotrebljavaju se samo otopine glavne mješavine koje ne sadrže reagense koji bi mogli prouzročiti lažne rezultate zbog prisutnosti životinjskog DNK-a ⁽²⁾.

2.2.2.1.2.3. Reagensi za dekontaminaciju

2.2.2.1.2.3.1. Otopina kloridne kiseline (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Izbjeljivač (otopina natrijevog hipoklorita s 0,15 % aktivnog klora)

2.2.2.1.2.3.3. Nehrđajući reagensi za dekontaminaciju skupih uređaja kao što su analitičke vage (npr. DNA Erase™ proizvođača MP Biomedicals)

2.2.2.2. Oprema

2.2.2.2.1. Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g

2.2.2.2.2. Pribor za mljevenje

2.2.2.2.3. Uređaj za PCR (Thermocycler) koji omogućava PCR u stvarnom vremenu

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga za mikroeprovete

2.2.2.2.5. Komplet mikropipeta koje omogućavaju pipetiranje od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardna plastična oprema za mikrobiologiju: mikroeprovete za mikrocentrifugu, plastični nastavci s filtrima za mikropipete, odgovarajuće pločice za uređaj za PCR (thermocycler).

2.2.2.2.7. Hladnjaci za skladištenje uzoraka i reagensa

2.2.3. *Uzorkovanje i priprema uzorka*

2.2.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak uzet u skladu s odredbama iz Priloga I.

2.2.3.2. Priprema uzorka

Pri pripremi laboratorijskih uzoraka do ekstrakcije DNK-a potrebno je poštovati zahtjeve iz Priloga II. Od najmanje 50 g uzorka se napravi poduzorak za analizu, koji se zatim samelje.

Priprema uzorka mora se provesti u drugom prostoru od onih koji se koriste za ekstrakciju DNK-a i umnožavanje genskog materijala u skladu sa standardom ISO 24276.

Pripreme se dva testna uzorka od najmanje 100 mg svaki.

2.2.4. *Ekstrakcija DNK-a*

Ekstrakcija DNK-a provodi se na svakom pripremljenom testnom uzorku koristeći SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

Za svaku seriju ekstrakcije DNK-a pripremaju se dva kontrolna uzorka kako je opisano u ISO standardu 24276:

— slijepi kontrolni uzorak ekstrakcije,

— pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a.

⁽¹⁾ Popis ovih početnica i sondi za svaku ciljanu životinjsku vrstu dostupan je na internetskoj stranici EURL-AP-a.

⁽²⁾ Primjeri glavnih mješavina koje su funkcionalne dostupni su na internetskoj stranici EURL-AP-a.

▼ **M2**2.2.5. *Umnožavanje genskog materijala*

Genski materijal se umnožava koristeći metode validirane za svaku vrstu koja zahtijeva identifikaciju. Te metode su propisane u SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici. Svaki ekstrakt DNK-a se analizira u najmanje dva različita razrjeđenja kako bi se ocijenila inhibicija.

Za svaku ciljanu vrstu pripremaju se dva kontrolna uzorka koja se umnažaju kako je opisano u ISO standardu 24276:

- pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR,
- kontrolni uzorak reagensa za umnožavanje (zove se također kontrolni uzorak bez matrice) se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.

2.2.6. *Tumačenje i prikaz rezultata*

U izvješću o rezultatima laboratorij mora navesti najmanje masu upotrijebljenog testnog uzorka, korištene tehnike za ekstrakciju, broj provedenih određivanja i granicu detekcije metode.

Rezultati se ne smiju tumačiti i priopćavati ako pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a i pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om ne omogućavaju određivanje ciljane vrste pri analizi, dok je rezultat kontrolnog uzorka reagensa za umnožavanje negativan.

U slučaju da rezultati dvaju testnih uzoraka nisu dosljedni, potrebno je ponoviti barem korak genskog umnožavanja. Ako laboratorij sumnja da razlog za nesukladnost mogu biti ekstrakti DNK-a, provodi se nova ekstrakcija DNK-a i umnažanje genskog materijala prije tumačenja rezultata.

Konačni prikaz rezultata mora se temeljiti na integraciji i tumačenju rezultata dvaju testnih uzoraka u skladu sa SOP-om koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internetskoj stranici.

2.2.6.1. *Negativni rezultat*

O negativnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

U dostavljenom uzorku nije bio otkriven ni jedan DNK iz X (X je životinjska vrsta ili skupina životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

2.2.6.2. *Pozitivni rezultat*

O pozitivnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

DNK iz X je otkriven u dostavljenom uzorku (X je životinjska vrsta ili skupina životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

▼ **M9***PRILOG VII.***METODA IZRAČUNA ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANE ZA PERAD****1. METODA IZRAČUNA I IZRAŽAVANJA ENERGETSKE VRIJEDNOSTI**

Energetska vrijednost krmnih smjesa za perad mora se izračunati prema sljedećoj formuli na temelju postotka nekih analitičkih sastojaka hrane za životinje. Ova se vrijednost izražava u megadžulima (MJ) metaboličke energije (ME), s korekcijama za dušik, na kilogram krmne smjese:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ sirovih bjelančevina} + 0,3431 \times \% \text{ sirovih masti} + 0,1669 \times \% \text{ škroba} + 0,1301 \times \% \text{ ukupnog šećera (izraženog kao saharoza)}.$$

2. Odstupanja primjenjiva za navedene vrijednosti

Ako se službenom inspekcijom otkrije razlika (povećana ili smanjena energetska vrijednost hrane za životinje) između rezultata pregleda i navedene energetske vrijednosti, dopušteno je odstupanje od 0,4 MJ/kg ME.

3. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Nakon primjene gore navedene formule dobiveni rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

4. METODE UZORKOVANJA I METODE ANALIZE

Uzorkovanje krmnih smjesa i određivanje udjela analitičkih sastojaka navedenih u metodi izračuna moraju se provesti u skladu s metodama za uzorkovanje odnosno analitičkim metodama Unije za službenu kontrolu hrane za životinje.

Primjenjuje se sljedeće:

- za određivanje udjela sirove masti: postupak B metode za određivanje sirovih ulja i masti iz dijela G Priloga III,
- za određivanje udjela škroba: polarimetrijska metoda iz dijela K Priloga III.

METODA IZRAČUNA ENERGETSKE VRIJEDNOSTI KRMIVA I KRMNIH SMJESA ZA MAČKE I PSE

Energetska vrijednost krmiva i krmnih smjesa za mačke i pse izračunava se u skladu s normom EN 16967 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Jednadžbe za predviđanje metabolizirane energije u potpunoj i dodatnoj hrani (hrani za ljubimce) za mačke i pse uključujući dijetnu hranu.

▼ **M9**▼ **B***PRILOG IX.***KORELACIJSKE TABLICE IZ ČLANKA 6.****1. Direktiva 71/250/EEZ**

Direktiva 71/250/EEZ	Ova Uredba
Članak 1. prvi podstavak	Članak 3.
Članak 1. drugi podstavak	Članak 2.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	Prilog II.
Prilog, dio 2.	—
Prilog, dio 3.	—
Prilog, dio 4.	Prilog III., dio O
Prilog, dio 5.	Prilog III., dio M
Prilog, dio 6.	Prilog III., dio N
Prilog, dio 7.	Prilog III., dio Q
Prilog, dio 9.	Prilog III., dio K
Prilog, dio 10.	—
Prilog, dio 11.	—
Prilog, dio 12.	Prilog III., dio J
Prilog, dio 14.	Prilog III., dio D
Prilog, dio 16.	—

2. Direktiva 71/393/EEZ

Direktiva 71/393/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio I.	Prilog III., dio A
Prilog, dio II.	Prilog III., dio E
Prilog, dio III.	Prilog III., dio P
Prilog, dio IV.	Prilog III., dio H

3. Direktiva 72/199/EEZ

Direktiva 72/199/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog I., dio 1.	Prilog III., dio L
Prilog I., dio 2.	Prilog III., dio C
Prilog I., dio 3.	—
Prilog I., dio 4.	—
Prilog I., dio 5.	Prilog V., dio A
Prilog II.	—

▼B**4. Direktiva 73/46/EEZ**

Direktiva 73/46/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog I., dio 1.	Prilog III., dio B
Prilog I., dio 2.	—
Prilog I., dio 3.	Prilog III., dio I

5. Direktiva 76/371/EEZ

Direktiva 76/371/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 1.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog I.

6. Direktiva 76/372/EEZ

Direktiva 76/372/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

7. Direktiva 78/633/EEZ

Direktiva 78/633/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	—
Prilog, dio 2.	—
Prilog, dio 3.	Prilog IV., dio C

8. Direktiva 81/715/EEZ

Direktiva 81/715/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

9. Direktiva 84/425/EEZ

Direktiva 84/425/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	—
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	—

▼B**10. Direktiva 86/174/EEZ**

Direktiva 86/174/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 4.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog VII.

11. Direktiva 93/70/EEZ

Direktiva 93/70/EEZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog	Prilog IV., dio D

12. Direktiva 93/117/EZ

Direktiva 93/117/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Prilog, dio 1.	Prilog IV., dio E
Prilog, dio 2.	Prilog VIII., dio A

13. Direktiva 98/64/EZ

Direktiva 98/64/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog, dio A	Prilog III., dio F
Prilog, dio C	Prilog VIII., dio B

14. Direktiva 1999/27/EZ

Direktiva 1999/27/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članci 3. i 5.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Članak 6.	—
Članak 7.	—
Prilog, dio A	Prilog VIII., dio C
Prilog, dio B	Prilog IV., dio F
Prilog, dio C	Prilog VIII., dio D

▼B**15. Direktiva 1999/76/EZ**

Direktiva 1999/76/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog	Prilog IV., dio G

16. Direktiva 2000/45/EZ

Direktiva 2000/45/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Prilog, dio A	Prilog IV., dio A
Prilog, dio B	Prilog IV., dio B
Prilog, dio C	Prilog III., dio G

17. Direktiva 2002/70/EZ

Direktiva 2002/70/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 1.
Članak 2.	Članci 2. i 3.
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Prilog I.	Prilog I. i Prilog V., dio B(I.)
Prilog II.	Prilog II. i Prilog V., dio B(II.)

18. Direktiva 2003/126/EZ

Direktiva 2003/126/EZ	Ova Uredba
Članak 1.	Članak 3.
Članak 2.	—
Članak 3.	—
Članak 4.	—
Članak 5.	—
Članak 6.	—
Prilog	Prilog VI.