2024/771

15.3.2024

PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2024/771

ze dne 29. února 2024,

kterým se mění nařízení (ES) č. 152/2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv

(Text s významem pro EHP)

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/625 ze dne 15. března 2017 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001, (ES) č. 396/2005, (ES) č. 1069/2009, (ES) č. 1107/2009, (EU) č. 1151/2012, (EU) č. 652/2014, (EU) 2016/429 a (EU) 2016/2031, nařízení Rady (ES) č. 1/2005 a (ES) č. 1099/2009 a směrnic Rady 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES a 2008/120/ES a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004 a (ES) č. 882/2004, směrnic Rady 89/608/EHS, 89/662/EHS, 90/425/EHS, 91/496/EHS, 96/23/ES, 96/93/ES a 97/78/ES a rozhodnutí Rady 92/438/EHS (nařízení o úředních kontrolách) ([1]), a zejména na čl. 34 odst. 6 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ([2]) stanoví metody odběru vzorků a analýzy pro úřední kontrolu krmiv.

(2) Metody odběru vzorků a analýzy stanovené nařízením (ES) č. 152/2009 by měly být přizpůsobeny vývoji vědeckých a technických poznatků. Tímto nařízením by mělo být zavedeno několik drobných změn zohledňujících zkušenosti získané při používání určité metody analýzy nebo za účelem objasnění některých ustanovení.

(3) Metoda odběru vzorků popsaná v nařízení (ES) č. 152/2009 není vhodná pro odběr vzorků pro kontrolu mikrobiologické kontaminace, a proto je tato metoda z oblasti působnosti uvedeného nařízení vyloučena. Jelikož však po změně provedené nařízením Komise (EU) č. 691/2013 ([3]) již z oblasti působnosti výslovně vyloučena nebyla, vedlo to k určitým nejasnostem, a je proto vhodné ji z oblasti působnosti výslovně vyloučit.

(4) Vzhledem k tomu, že narůstá objem prodeje krmiv komunikačními prostředky na dálku, je vhodné zavést zvláštní ustanovení pro odběr vzorků krmiv, která provozovatelé krmivářských podniků nabízejí k prodeji komunikačními prostředky na dálku. Ustanovení o nejistotě měření při analýze a výtěžnosti, která jsou již zavedena v případě analýzy na nežádoucí látky, by měla být zavedena i pro analýzu obsahu doplňkových látek, protože daná ustanovení jsou relevantní i v uvedeném případě. Jelikož existují důkazy o tom, že použití metody analýzy pro stanovení obsahu močoviny mimo rozsah povolení močoviny jako doplňkové látky vede k nesprávným výsledkům analýzy, měl by být rozsah uvedené metody upřesněn a měly by být doplněny informace o hodnocení dané metody a výsledky kolaborativní studie.

(5) Několik metod analýzy zavedených nařízením (ES) č. 152/2009 by mělo být vypuštěno, jelikož již nejsou platné pro zamýšlený účel. Metoda analýzy pro stanovení obsahu těkavých dusíkatých bází a metoda pro stanovení obsahu uhličitanů by měly být vypuštěny, protože v právních předpisech Unie týkajících se krmiv již neexistuje žádný právní požadavek na kontrolu souladu. Stávající metoda analýzy pro stanovení diklazurilu obsahuje redakční chyby, a proto neposkytuje spolehlivé výsledky analýzy. Měla by být proto nahrazena upravenou metodou, u níž bylo prokázáno, že spolehlivé výsledky poskytuje. Nové metody analýzy pro analýzu volného a celkového gossypolu prokázaly, že metoda analýzy pro stanovení volného a celkového gossypolu stanovená nařízením (ES) č. 152/2009

([1]) Úř. věst. L 95, 7.4.2017, s. 1.
([2]) Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro ústřední kontrolu krmiv (Úř. věst. L 54, 26.2.2009, s. 1).
([3]) Nařízení Komise (EU) č. 691/2013 ze dne 19. července 2013, kterým se mění nařízení (ES) č. 152/2009, pokud jde o metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení (Úř. věst. L 197, 20.7.2013, s. 1).

neposkytuje spolehlivé výsledky, a proto by měla být vypuštěna a nahrazena odkazem na evropské normy (normy EN). Metody analýzy pro kontrolu nepřípustné přítomnosti doplňkových látek, které v krmivech již nejsou povoleny, by měly být vypuštěny, jelikož mezitím byly vyvinuty citlivější screeningové postupy a metody analýzy.

(6) Kromě metod analýzy popsaných v přílohách tohoto nařízení by měl být uveden odkaz na normy EN, které se mají při úřední kontrole používat.

(7) Jelikož prováděcím nařízením Komise (EU) 2021/2047 ([4]) byla povolena nová doplňková látka amprolium, měla by být do přílohy IV nařízení (ES) č. 152/2009 doplněna metoda analýzy pro stanovení obsahu amprolia.

(8) Vzhledem k tomu, že změny nařízení (ES) č. 152/2009 jsou podstatné a týkají se řady ustanovení v jeho přílohách, je z důvodu jasnosti vhodné nahradit uvedené přílohy v celém rozsahu.

(9) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro rostliny, zvířata, potraviny a krmiva,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Změny nařízení (ES) č. 152/2009

Nařízení (ES) č. 152/2009 se mění takto:

(1) V článku 1 se první pododstavec nahrazuje tímto:

„Odběr vzorků pro úřední kontrolu krmiv, zejména pokud jde o stanovení jejich složek, včetně materiálů, které obsahují geneticky modifikované organismy (GMO), sestávají z nich nebo jsou z nich vyrobeny, doplňkových látek, jak jsou definovány nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 (*), a nežádoucích látek, jak jsou definovány směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES (**), se provádí podle metod stanovených v příloze I, s výjimkou odběru vzorků pro kontrolu mikrobiologické kontaminace.

(*) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat (Úř. věst. L 268, 18.10.2003, s. 29).
(**) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech (Úř. věst. L 140, 30.5.2002, s. 10).“

(2) Příloha I se nahrazuje zněním uvedeným v příloze I tohoto nařízení.

(3) Příloha II se nahrazuje zněním uvedeným v příloze II tohoto nařízení.

(4) Příloha III se nahrazuje zněním uvedeným v příloze III tohoto nařízení.

(5) Příloha IV se nahrazuje zněním uvedeným v příloze IV tohoto nařízení.

(6) Příloha V se nahrazuje zněním uvedeným v příloze V tohoto nařízení.

(7) Příloha VII se nahrazuje zněním uvedeným v příloze VI tohoto nařízení.

(8) Příloha VIII se zrušuje.

([4]) Prováděcí nařízení Komise (EU) 2021/2047 ze dne 23. listopadu 2021 o povolení amprolia hydrochloridu (COXAM) jako doplňkové látky pro výkrm kuřat a odchov kuřat a kuřice (držitel povolení: HuvePharma NV) (Úř. věst. L 418, 24.11.2021, s. 13).

Článek 2

Vstup v platnost

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 29. února 2024.

Za Komisi
předsedkyně
Ursula VON DER LEYEN

PŘÍLOHA I

„PŘÍLOHA I

METODY ODBĚRU VZORKŮ

1. ÚČEL A OBLAST POUŽITÍ

Vzorky určené pro úřední kontrolu krmiv se odeberou podle níže popsaných metod. Takto získané vzorky se považují za reprezentativní pro vzorkované partie.

Účelem odběru reprezentativních vzorků je získat malou frakci z šarže takovým způsobem, aby stanovení jakékoli konkrétní vlastnosti této frakce odpovídalo střední hodnotě vlastnosti šarže. Šarže se vzorkuje opakovaným odběrem dílčích vzorků v různých místech šarže. Tyto dílčí vzorky se spojí smícháním tak, aby vznikl jeden souhrnný vzorek, z něhož se reprezentativním dělením připraví konečné reprezentativní vzorky.

Pokud na základě vizuální kontroly či jiných relevantních informací vykazují partie krmiva, které mají být vzorkovány, odlišnost v kvalitě od zbytku krmiva z téže šarže, oddělí se tyto partie od zbytku krmiva a zachází se s nimi jako se samostatnou dílčí šarží. Pokud není možné rozdělit krmivo do samostatných dílčích šarží, vzorkuje se krmivo jako jedna šarže. V takových případech se tato skutečnost uvede do protokolu o odběru vzorku.

Je-li krmivo vzorkované v souladu s ustanoveními tohoto nařízení označeno jako krmivo, které nesplňuje požadavky EU, a je-li částí šarže krmiva stejné třídy nebo popisu, má se za to, že všechno krmivo dané šarže vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

Odběr vzorků může rovněž zahrnovat krmiva, která provozovatelé krmivářských podniků nabízejí k prodeji komunikačními prostředky na dálku v souladu s čl. 11 odst. 3 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 ([1]). Odběr vzorků krmiv nabízených k prodeji komunikačními prostředky na dálku se v zásadě uskutečňuje podle bodů uvedených v této příloze. Zvláštní aspekty odběru vzorků prodeje na dálku jsou popsány v bodě 11.

2. DEFINICE

— Šarže (nebo partie): identifikovatelné množství krmiva, které má vykazovat jednotné vlastnosti, jako je původ, druh, typ balení, balírna, dodavatel nebo označení, a v případě výrobního procesu jednotka vyrobeného množství z jednoho výrobního zařízení za použití jednotných výrobních parametrů nebo řada takových jednotek, pokud jsou vyráběny kontinuálně a skladovány společně.

— Vzorkovaná partie: šarže nebo identifikovaná část šarže nebo dílčí šarže.

— Zapečetěný vzorek: vzorek zapečetěný tak, aby k němu nebyl možný přístup bez porušení nebo odstranění pečeti.

— Dílčí vzorek: množství odebrané v jednom bodě vzorkované partie.

— Souhrnný vzorek: souhrn dílčích vzorků odebraných ze stejné vzorkované partie.

— Redukovaný vzorek: část souhrnného vzorku, která se získá reprezentativní redukcí jeho množství.

— Konečný vzorek: část souhrnného vzorku (směsného), redukovaného vzorku nebo homogenizovaného souhrnného vzorku v závislosti na typu kontroly (viz bod 9.4).

— Laboratorní vzorek: vzorek určený pro laboratoř (v podobě přijímané laboratoří), přičemž může jít o vzorek konečný, redukovaný nebo souhrnný.

— Vzorek prodeje na dálku: vzorek šarže nebo partie krmiva nabízeného k prodeji komunikačními prostředky na dálku.

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 ze dne 13. července 2009 o uvádění na trh a používání krmiv, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 a o zrušení směrnice Rady 79/373/EHS, směrnice Komise 80/511/EHS, směrnic Rady 82/471/EHS, 83/228/EHS, 93/74/EHS, 93/113/ES a 96/25/ES a rozhodnutí Komise 2004/217/ES (Úř. věst. L 229, 1.9.2009, s. 1).

3. OBECNÁ USTANOVENÍ

— Odběr vzorků provádí osoby k tomu oprávněné příslušným orgánem.

— U vzorku prodeje na dálku si příslušný orgán vyžádá od provozovatele krmivářského podniku určité množství krmiva komunikačními prostředky na dálku.

— Vzorek musí být zapečetěn tak, aby k němu nebyl možný přístup bez porušení nebo odstranění pečeti.

  Značka pečeti by měla být jednoznačně identifikovatelná a jasně viditelná.

— Identifikace vzorku: vzorek musí být nesmazatelně označen a musí být identifikován tak, aby existovala jednoznačná vazba na protokol o odběru vzorku.

— Z každého souhrnného vzorku nebo redukovaného vzorku se odeberou tyto konečné vzorky: jeden pro účely kontroly (vymahatelnosti) a jeden pro provozovatele krmivářského podniku (vzorek pro účely obhajoby). Případně je možné odebrat jeden další konečný vzorek pro účely srovnání. Pokud je celý souhrnný vzorek homogenizovaný, konečné vzorky se odeberou z homogenizovaného souhrnného vzorku, pokud tento postup není v rozporu s pravidly členských států ohledně práv provozovatelů krmivářských podniků.

— V souladu s čl. 15 odst. 1 a 2 nařízení (EU) 2017/625 provozovatelé krmivářských podniků, je-li to nezbytné pro provádění úředního odběru vzorků a jestliže to příslušné orgány požadují:

  — poskytnou pracovníkům příslušných orgánů přístup k vybavení pod svou kontrolou, v případě nutnosti včetně poskytnutí vhodného zařízení pro odběr vzorků a osobních ochranných prostředků,

  — jsou pracovníkům příslušných orgánů nápomocni a spolupracují s nimi s cílem umožnit odběr vzorků, včetně toho, že pracovníkům příslušných orgánů krmiva zpřístupní.

4. PŘÍSTROJE

4.1. Přístroje určené k odběru vzorků musí být vyrobeny z materiálů, které nemohou kontaminovat produkty, u nichž má být odběr vzorků proveden. Přístroje, které jsou určeny k opakovanému použití, musí být snadno čistitelné, aby se zamezilo křížové kontaminaci.

4.2. **Přístroje doporučené pro odběr vzorků pevných krmiv**

4.2.1. *Ruční odběr vzorků*

4.2.1.1. Lopatka pro odběr vzorků s rovným dnem a vertikálními okraji.

4.2.1.2. Vzorkovač s dlouhým žlábkem nebo vzorkovací krabice. Rozměry vzorkovače musí být přiměřené vlastnostem vzorkované partie (hloubce nádoby, rozměrům pytle apod.) a velikosti částic krmiva.

V případě, že má vzorkovač několik otvorů, měly by být pro zajištění odběru na různých místech podél vzorkovače otvory prostorově odděleny nebo pravidelně rozloženy.

4.2.2. *Mechanický odběr vzorků*

Pro odběr vzorků krmiva v pohybu lze použít vhodná mechanická zařízení. Mechanické zařízení se považuje za vhodné, pokud odebírá vzorek alespoň z celé sekce pohybu krmiva.

Odběr vzorků z krmiva v pohybu (při silném průtoku) lze provádět automatickými vzorkovači.

4.2.3. *Dělič*

Pokud je to možné a vhodné, měl by se při přípravě reprezentativních redukovaných vzorků používat přístroj určený k dělení vzorků do přibližně stejných částí.

5. KVANTITATIVNÍ POŽADAVKY NA POČET DÍLČÍCH VZORKŮ

— Kvantitativní požadavky v bodech 5.1 a 5.2 na počet dílčích vzorků jsou použitelné na vzorkované partie o velikosti maximálně 500 tun, z nichž lze odebírat vzorky reprezentativním způsobem. Popsaný postup odběru vzorků je rovněž platný pro množství přesahující předepsanou maximální velikost vzorkované partie, pokud se nepřihlíží k maximálnímu počtu dílčích vzorků uvedenému v tabulkách obsažených v bodech 5.1.1, 5.1.3 a 5.1.5, kdy se počet dílčích vzorků určí na základě vzorce druhé odmocniny uvedené v příslušné části postupu (viz bod 5.3) a velikost minimálního souhrnného vzorku odpovídajícím způsobem vzroste. To nebrání tomu, aby byly velké šarže rozděleny do menších dílčích šarží a aby byla každá dílčí šarže vzorkována v souladu s postupem popsaným v bodě 5.1 a 5.2.

— Velikost vzorkované partie musí být taková, aby bylo možné odebrat vzorky ze všech jejích částí.

— V případě velmi velkých šarží a dílčích šarží (> 500 tun) a v případě šarží, které jsou přepravovány nebo skladovány tak, že není možné z nich odebrat vzorky v souladu s postupem pro odběr vzorků stanoveným v bodě 5.1 a 5.2 tohoto bodu, se použije postup odběru vzorků stanovený v bodě 5.3.

— U vzorků prodeje na dálku příslušný orgán obvykle nezná velikost šarže, z níž je dané množství vzorků požadováno. Proto nelze použít postup uvedený v bodech 5.1 a 5.2. V takovém případě se použije postup popsaný v bodě 11.

— V případě, že musí provozovatel krmivářského podniku podle požadavků právních předpisů postupovat v souladu s tímto nařízením v rámci povinného systému monitorování, smí se odchýlit od kvantitativních požadavků stanovených v tomto bodě za účelem zohlednění provozních vlastností za podmínky, že provozovatel krmivářského podniku ke spokojenosti příslušného orgánu prokázal rovnocennost postupu odběru vzorků z hlediska reprezentativnosti, a poté, co obdrží povolení příslušného orgánu.

— Ve výjimečných případech, pokud není možné použít metodu odběru vzorků z hlediska kvantitativních požadavků z důvodu nepřijatelných hospodářských důsledků vyplývajících z poškození šarže (kvůli formě obalu, způsobu přepravy, způsobu skladování atd.), může být použita alternativní metoda odběru vzorků za předpokladu, že je co nejreprezentativnější a je v úplnosti popsána a zdokumentována.

5.1. **Kvantitativní požadavky na dílčí vzorky v souvislosti s kontrolou látek nebo produktů rozložených v krmivu rovnoměrně**

5.1.1. *Volně ložené pevné krmivo*

Velikost vzorkované partie	Minimální počet dílčích vzorků
≤ 2,5 tuny	7
> 2,5 tuny	√ (20 krát počet tun tvořících vzorkovanou partii) (*) , maximálně 40 dílčích vzorků

(*) Pokud výsledné číslo tvoří zlomek, zaokrouhlí se nahoru na nejbližší celé číslo.

5.1.2. *Volně ložené tekuté krmivo*

Velikost vzorkované partie	Minimální počet dílčích vzorků
≤ 2,5 tuny nebo ≤ 2 500 litrů	4 (*)
> 2,5 tuny nebo > 2 500 litrů	7 (*)

(*) V případě, že není možné kapalinu homogenizovat, je třeba zvýšit počet dílčích vzorků.

5.1.3. *Balené krmivo*

Krmivo (pevné i tekuté) může být baleno v pytlích, plechovkách, barelech atd., které se v tabulce níže označují jako balení. Odběr vzorků z velkých balení (≥ 500 kg nebo litrů) musí být prováděn v souladu s ustanoveními platnými pro volně ložené krmivo (viz body 5.1.1 a 5.1.2).

Velikost vzorkované partie	Minimální počet balení, z nichž musí být odebrán (alespoň) jeden dílčí vzorek (*)
1 až 20 balení	1 balení (**)
21 až 150 balení	3 balení (**)
151 až 400 balení	5 balení (**)
> 400 balení	¼ √ (počtu balení tvořících vzorkovanou partii) (***) , maximálně 40 balení

(*) V případě, kdy otevření balení může nepříznivě ovlivnit analýzu (např. vlhká krmiva podléhající zkáze), se za dílčí vzorek považuje neotevřené balení.
(**) U balení, jejichž obsah nepřesahuje jeden kg nebo jeden litr, se za dílčí vzorek považuje obsah jednoho původního balení.
(***) Pokud výsledné číslo tvoří zlomek, zaokrouhlí se nahoru na nejbližší celé číslo.

5.1.4. *Krmiva v blocích a minerální lizy*

Nejméně jeden blok nebo liz ke vzorkování na jednu vzorkovanou partii obsahující 25 jednotek, maximálně čtyři bloky nebo lizy.

V případě bloků nebo lizů o hmotnosti nejvýše jeden kg se za dílčí vzorek považuje obsah jednoho bloku nebo jednoho lizu.

5.1.5. *Objemná krmiva/pícniny*

Velikost vzorkované partie	Minimální počet dílčích vzorků (*)
≤ 5 tun	5
> 5 tun	√ (5krát počet tun tvořících vzorkovanou partii) (**) , maximálně 40 dílčích vzorků

(*) Má se za to, že v některých situacích (např. u siláží) není možné odebrat požadované dílčí vzorky, aniž by přitom došlo k nepřijatelnému poškození šarže. V takových situacích je možné použít alternativní metodu odběru vzorků a pro odběr vzorků z těchto šarží byly vypracovány pokyny, které jsou k dispozici na adrese: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.
(**) Pokud výsledné číslo tvoří zlomek, zaokrouhlí se nahoru na nejbližší celé číslo.

5.2. **Kvantitativní požadavky na dílčí vzorky v souvislosti s kontrolou složek nebo látek, které jsou v krmivu pravděpodobně rozloženy nerovnoměrně**

Tyto kvantitativní požadavky na dílčí vzorky se použijí v těchto situacích:

— při kontrole aflatoxinů, námelu žitného, jiných mykotoxinů a škodlivých botanických nečistot v krmných surovinách,

— při kontrole křížové kontaminace některou ze složek, včetně geneticky modifikovaného materiálu, nebo látkou, u níž se předpokládá, že je v krmivu rozložena nerovnoměrně.

V případě, že má kontrolní orgán silné podezření, že k tomuto nerovnoměrnému rozložení dochází také v případě křížové kontaminace některou ze složek nebo látkou v krmných směsích, mohou se uplatnit kvantitativní požadavky stanovené v tabulce níže.

Velikost vzorkované partie	Minimální počet dílčích vzorků
< 80 tun	Viz kvantitativní požadavky v bodě 5.1. Počet dílčích vzorků, které mají být odebrány, se musí vynásobit 2,5.
≥ 80 tun	100

5.3. **Kvantitativní požadavky na dílčí vzorky v případě velmi velkých šarží**

V případě velkých vzorkovaných partií (vzorkované partie o hmotnosti > 500 tun) se počet dílčích vzorků, které mají být odebrány, rovná součtu 40 dílčích vzorků + √ tun v souvislosti s kontrolou látek nebo produktů rozložených v krmivu rovnoměrně nebo 100 dílčích vzorků + √ tun v souvislosti s kontrolou složek nebo látek, které jsou v krmivu pravděpodobně rozloženy nerovnoměrně.

6. KVANTITATIVNÍ POŽADAVKY NA SOUHRNNÝ VZOREK

Požaduje se jeden souhrnný vzorek na jednu vzorkovanou partii.

	Druh krmiva	Minimální velikost souhrnného vzorku (*) (**)
6.1	Volně ložené krmivo	4 kg
6.2	Balené krmivo:	4 kg (***)
6.3	Tekuté nebo polotekuté krmivo:	4 litry
6.4	Krmiva v blocích nebo minerální lizy:	
6.4.1	o hmotnosti vyšší než 1 kg	4 kg
6.4.2	o hmotnosti nejvýše 1 kg	hmotnost čtyř originálních bloků nebo lizů
6.5	Objemná krmiva/pícniny	4 kg (****)

(*) V případě, že je vzorkované krmivo vysoké hodnoty, lze odebrat menší množství souhrnného vzorku za podmínky, že je tato skutečnost popsána a zdokumentována v protokolu o odběru vzorků.

(**) V souladu s ustanoveními nařízení Komise (EU) č. 619/2011 ze dne 24. června 2011, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv z hlediska přítomnosti geneticky modifikovaného materiálu, u nějž probíhá postup povolování nebo u nějž uplynula platnost povolení (Úř. věst. L 166, 25.6.2011, s. 9), musí souhrnný vzorek pro kontrolu přítomnosti geneticky modifikovaného materiálu obsahovat alespoň 35000 semen/zrn. To znamená, že v případě kukuřice musí velikost souhrnného vzorku činit nejméně 10,5 kg a v případě sójových bobů 7 kg. V případě ostatních semen a zrn, jako je ječmen, proso, oves, rýže, žito, pšenice a semena řepky olejné, odpovídá souhrnný vzorek o hmotnosti 4 kg více než 35 000 semen/zrn.

(***) V případě baleného krmiva rovněž nemusí být možné dosáhnout u souhrnného vzorku hmotnosti 4 kg v závislosti na velikosti jednotlivých balení.

(****) V případě, že se jedná o objemná krmiva/pícniny s nízkou měrnou hmotností (např. seno, sláma), měl by mít souhrnný vzorek minimální hmotnost 1 kg.

7. KVANTITATIVNÍ POŽADAVKY NA KONEČNÉ VZORKY

Konečné vzorky

Požaduje se provedení analýzy alespoň u jednoho konečného vzorku. Množství v konečném vzorku pro analýzu nesmí být nižší než:

Pevná krmiva	500 g (*) (**) (***) (****)
Tekutá nebo polotekutá krmiva	500 ml (*)

(*) V souladu s ustanoveními nařízení (EU) 619/2011 musí konečný vzorek pro kontrolu přítomnosti geneticky modifikovaného materiálu obsahovat alespoň 10 000 semen/zrn. To znamená, že v případě kukuřice musí velikost konečného vzorku činit nejméně 3 000 g a v případě sójových bobů 2 000 g. V případě ostatních semen a zrn, jako je ječmen, proso, oves, rýže, žito, pšenice a semena řepky olejné, odpovídá souhrnný vzorek o hmotnosti 500 g více než 10 000 semen/zrn.

(**) V případě, že je velikost souhrnného vzorku výrazně menší než 4 kg nebo litry (viz poznámky v bodě 6), lze rovněž odebrat menší množství konečného vzorku za podmínky, že je tato skutečnost popsána a zdokumentována v protokolu o odběru vzorku.

(***) V případě odběru vzorků lusků, obilných zrn a ořechů za účelem stanovení reziduí pesticidů činí minimální velikost konečného vzorku 1 kg v souladu s ustanoveními směrnice Komise 2002/63/ES ze dne 11. července 2002, kterou se stanoví metody Společenství pro odběr vzorků určených k úřední kontrole reziduí pesticidů v produktech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a kterou se zrušuje směrnice 79/700/EHS (Úř. věst. L 187, 16.7.2002, s. 30).

(****) V případě vizuální prohlídky nebo zkoumání mikroskopem činí množství konečného vzorku ke zkoušce 1 kg.

8. METODA ODBĚRU VZORKŮ PRO VELMI VELKÉ ŠARŽE NEBO ŠARŽE SKLADOVANÉ NEBO PŘEPRAVOVANÉ TAK, ŽE ODBĚR VZORKŮ V CELÉ ŠARŽI NENÍ PROVEDITELNÝ

8.1. **Obecné zásady**

V případě, že způsob přepravy nebo skladování šarže neumožňuje odběr dílčích vzorků z celé šarže, měl by se odběr z těchto šarží pokud možno provádět tehdy, když je šarže v pohybu.

V případě velkých skladů určených ke skladování krmiv by měli být provozovatelé nabádáni, aby do skladu nainstalovali zařízení, které umožní (automatický) odběr vzorků z celé skladované šarže.

V případě uplatňování postupů odběru vzorků stanovených v tomto bodě se o postupu odběru vzorků informuje provozovatel krmivářského podniku nebo jeho zástupce. V případě, že provozovatel krmivářského podniku nebo jeho zástupce tento postup odběru vzorků zpochybní, umožní provozovatel krmivářského podniku nebo jeho zástupce příslušnému orgánu odběr vzorků z celé šarže na náklady provozovatele.

8.2. **Velké šarže přepravované lodí**

8.2.1. *Dynamický odběr vzorků z velkých šarží přepravovaných lodí*

Odběr vzorků z velkých šarží na lodích se pokud možno provádí tehdy, když je produkt v pohybu (dynamický odběr vzorků).

Odběr vzorků se provádí po nákladových prostorech (jednotka, kterou lze fyzicky oddělit). Nákladové prostory se však částečně jeden po druhém vyprazdňují, takže počáteční fyzické oddělení po přesunu do skladovacího zařízení již neexistuje. Odběr vzorků lze proto provádět při počátečním fyzickém oddělování nebo při oddělování po přesunu do skladovacího zařízení.

Vykládka lodi může trvat několik dní. Odběr vzorků musí být za běžných okolností prováděn v pravidelných intervalech po celou dobu trvání vykládky. Přítomnost úředního inspektora za účelem odběru vzorků po celou dobu vykládky však není vždy možná nebo vhodná. Je proto možné provést odběr vzorků u části (vzorkovaná partie) celé šarže. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie.

V případě, že se vzorky odebírají z části šarže krmiva stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

Přítomnost inspektora je nezbytná, i když se úřední vzorek odebírá automaticky. Avšak v případě, že za účelem zabránění podvodům probíhá automatický odběr vzorků s předem stanovenými parametry, které nelze během odběru změnit, a že jsou dílčí vzorky odebírány do zapečetěné nádoby, je přítomnost inspektora nutná pouze na počátku odběru vzorků, dále pokaždé, kdy je nutno vyměnit nádobu se vzorky, a na konci odběru vzorků.

8.2.2. *Statický odběr vzorků z šarží přepravovaných lodí*

V případech, kdy je odběr vzorků prováděn statickým způsobem, se musí použít stejný postup jako pro shora přístupná skladovací zařízení (sila) (viz bod 8.4.1).

Odběr vzorků se musí provádět na (shora) přístupné části šarže/nákladového prostoru. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie. V případě, že se vzorky odebírají z části šarže krmiva stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

8.3. **Odběr vzorků z velkých šarží uložených ve skladech**

Odběr vzorků se musí provádět na přístupné části šarže. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie. V případě, že se vzorky odebírají z části šarže krmiva stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

8.4. **Odběr vzorků ze skladovacích zařízení (sil)**

8.4.1. *Odběr vzorků ze (snadno) shora přístupných sil*

Odběr vzorků se musí provádět na přístupné části šarže. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie. V případě, že se vzorky odebírají z části šarže krmiva stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

8.4.2. *Odběr vzorků ze shora nepřístupných sil (uzavřených sil)*

8.4.2.1. Shora nepřístupná sila (uzavřená sila) o velikosti > 100 tun

Odběr vzorků krmiva skladovaného v těchto silech nelze provádět statickým způsobem. Pokud je třeba odebrat vzorky krmiva v takovém silu a není možné jeho obsah přemístit, je třeba se dohodnout s provozovatelem, že je povinen informovat inspektora o tom, kdy bude silo vykládáno, a umožnit mu odběr vzorků, až bude krmivo v pohybu.

8.4.2.2. Shora nepřístupná sila (uzavřená sila) o velikosti < 100 tun

Při odběru vzorků se postupuje tak, že se 50 až 100 kg krmiva upustí do nádoby a z ní se odebere vzorek. Velkost souhrnného vzorku odpovídá celé šarži a počet dílčích vzorků se řídí množstvím krmiva upuštěného ze sila do nádoby pro účely odběru vzorků. V případě, že se vzorky odebírají z části šarže krmiva stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.

8.5. **Odběr vzorků krmiva volně loženého ve velkých uzavřených kontejnerech**

Vzorky z těchto šarží lze často odebírat pouze při vykládce. V některých případech není vyložení v místě dovozu nebo kontroly možné, a odběr vzorků by proto měl proběhnout ve chvíli, kdy se tyto kontejnery vykládají.

9. POKYNY TÝKAJÍCÍ SE ODBĚRU, PŘÍPRAVY A BALENÍ VZORKŮ

9.1. **Obecně**

Vzorky musí být odebrány a připraveny bez zbytečného prodlení a musí být učiněna nutná předběžná opatření pro zajištění toho, aby produkt nebyl pozměněn či kontaminován. Nástroje, plochy a nádoby na vzorky musí být čisté a suché.

9.2. **Dílčí vzorky**

Odběry dílčích vzorků se musí provádět náhodně a rovnoměrně v celé vzorkované partii a velikost dílčích vzorků musí být přibližně stejná.

Velikost dílčího vzorku v případě objemných krmiv/pícnin s nízkou měrnou hmotností je alespoň 100 gramů, resp. 25 gramů.

V případě, že musí být v souladu s pravidly pro postup odběru vzorků stanovenými v bodě 8 odebráno méně než 40 dílčích vzorků, stanoví se velikost dílčích vzorků podle požadované velikosti souhrnného vzorku (viz bod 6).

V případě odběru vzorků z malých šarží baleného krmiva, kde je podle kvantitativních požadavků třeba odebrat omezený počet dílčích vzorků, se považuje za dílčí vzorek obsah jednoho původního balení, jehož obsah nepřesahuje jeden kg nebo jeden litr.

V případě odběru vzorků z baleného krmiva sestávajícího z malých balení (např. < 250 g) závisí velikost dílčího vzorku na velikosti balení.

V případě vzorků prodeje na dálku závisí velikost dílčího vzorku na velikosti balení a v jednotlivých případech může rovněž obsahovat méně než 100 g nebo 100 ml.

9.2.1. *Volně ložené krmivo*

V příslušných případech lze odebrat vzorky v průběhu manipulace se vzorkovanou partií (nakládka či vykládka).

9.2.2. *Balené krmivo*

Poté, co byl vybrán požadovaný počet balení k odebrání vzorků, který je stanoven v bodě 5, odebere se část obsahu každého balení pomocí vzorkovače nebo lopatky. V případě potřeby se vzorky odeberou po vyprázdnění každého balení zvlášť.

9.2.3. *Homogenní nebo homogenizovatelná tekutá nebo polotekutá krmiva*

Poté, co byl vybrán požadovaný počet balení k odebrání vzorků, jak je uvedeno v bodě 5, jejich obsah se v případě potřeby homogenizuje a z každého balení se odebere určité množství.

Dílčí vzorky mohou být odebrány během stáčení obsahu.

9.2.4. *Nehomogenizovatelná tekutá nebo polotekutá krmiva*

Poté, co byl vybrán požadovaný počet balení k odebrání vzorků, který je stanoven v bodě 5, provede se odběr v různých vrstvách.

Vzorky mohou být odebrány rovněž během stáčení obsahu, avšak až po odstranění prvních frakcí.

V obou případech nesmí být celkový objem odebraných vzorků nižší než 10 litrů.

9.2.5. *Krmiva v blocích a minerální lizy*

Poté, co byl vybrán požadovaný počet bloků nebo lizů k odebrání vzorků, který je stanoven v bodě 5, z každého bloku nebo lizu se odebere část. V případě podezření na nehomogenní blok nebo liz lze jako vzorek odebrat celý blok nebo liz.

V případě bloků nebo lizů o hmotnosti nejvýše 1 kg se za dílčí vzorek považuje obsah jednoho bloku nebo jednoho lizu.

9.3. **Příprava souhrnných vzorků**

Dílčí vzorky se smíchají, aby vznikl jeden souhrnný vzorek.

9.4. **Příprava konečných vzorků**

Materiál v souhrnném vzorku se pečlivě promísí ([2]).

([2]) Hrudky se rozdrtí (v případě potřeby se nejprve oddělí a po rozdrcení se vrátí do vzorku).

Každý vzorek se vloží do vhodné nádoby. Učiní se všechna nutná předběžná opatření pro to, aby během přepravy nebo skladování nedošlo ke změně složení vzorku, kontaminaci či narušení.

9.4.1. *Látky rozložené rovnoměrně*

V případě kontroly složek nebo látek rozložených v krmivu rovnoměrně lze souhrnný vzorek reprezentativně zredukovat na nejméně 2,0 kg nebo 2,0 litru (redukovaný vzorek) ([3]), nejlépe s pomocí mechanického nebo automatického děliče. Pro účely kontroly přítomnosti reziduí pesticidů v luštěninách, zrnech obilovin a ořeších činí minimální velikost redukovaného vzorku 3 kg. Pokud druh krmiva neumožňuje použít dělič nebo pokud dělič není k dispozici, lze vzorek redukovat kvartací.

Konečné vzorky (pro kontrolu, obhajobu a případně srovnání) ze souhrnného vzorku nebo z redukovaných vzorků se poté odeberou v přibližně stejném množství a v souladu s kvantitativními požadavky bodu 7.

9.4.2. *Látky rozložené nerovnoměrně*

V případě kontroly složek, včetně geneticky modifikovaného materiálu, nebo látek, které jsou v krmivu pravděpodobně rozloženy nerovnoměrně, musí být souhrnný vzorek:

i) zcela homogenizován. Konečné vzorky (pro kontrolu, obhajobu a případně srovnání) z homogenizovaného souhrnného vzorku se poté odeberou v přibližně stejném množství a v souladu s kvantitativními požadavky bodu 7 nebo

ii) zredukován na nejméně 2 kg nebo 2 litry ([4]) s použitím mechanického nebo automatického děliče. Pouze pokud druh krmiva neumožňuje použít dělič, lze vzorek v případě potřeby redukovat kvartací. Pro účely kontroly přítomnosti geneticky modifikovaného materiálu v rámci nařízení (EU) č. 619/2011 musí redukovaný vzorek obsahovat nejméně 35 000 semen/zrn, aby bylo možno získat konečné vzorky pro účely vymahatelnosti, obhajoby a případně srovnání o velikosti nejméně 10 000 semen/zrn (viz poznámka (**) v bodě 6 a poznámka (*) v bodě 7).

Konečné vzorky z redukovaného vzorku se poté odeberou v přibližně stejném množství a v souladu s kvantitativními požadavky bodu 7.

9.5. **Balení vzorků**

Nádoby nebo balení se zapečetí a opatří štítkem tak, aby je nebylo možno bez poškození pečeti otevřít. Celý štítek musí být součástí pečeti. Vzorek lze rovněž uložit do nádoby, kterou lze uzavřít tak, aby ji nebylo možné bez nevratného poškození nádoby otevřít, což zabrání jejímu opakovaném použití.

9.6. **Zaslání vzorků do laboratoře**

Vzorek se společně s údaji nutnými pro osobu provádějící analýzu bez zbytečného prodlení zašle do určené zkušební laboratoře.

10. PROTOKOL O ODBĚRU VZORKU

O každém vzorku musí být veden protokol, který umožní jednoznačně identifikovat každou vzorkovanou partii a její velikost.

Do protokolu se uvedou veškeré odchylky od postupu odběru vzorků stanoveného v tomto nařízení.

Protokol se kromě úřední kontrolní laboratoře dá k dispozici provozovateli krmivářského podniku a/nebo laboratoři určené provozovatelem krmivářského podniku.

([3]) S výjimkou objemných krmiv/pícnin s nízkou měrnou hmotností.
([4]) S výjimkou objemných krmiv/pícnin s nízkou měrnou hmotností.

11. VZOREK PRODEJE NA DÁLKU

— U vzorku prodeje na dálku se krmivo vyžádá od provozovatele krmivářského podniku komunikačními prostředky na dálku. V takovém případě se příslušný orgán při žádosti o krmivo nemusí provozovateli krmivářského podniku identifikovat úřední totožností a může použít krycí identitu.

— Souhrnný vzorek a konečné vzorky vzorku prodeje na dálku musí být odebrány ihned po obdržení zásilky osobami k tomu oprávněnými. K vytvoření souhrnného vzorku musí být z celkového opatřeného množství náhodně a rovnoměrně odebrán vhodný počet dílčích vzorků, které musí být pečlivě promíseny/homogenizovány, co nejvíce v souladu se zásadami stanovenými v bodě 5 a v bodech 9.2 a 9.3. Pokud je krmivo zabaleno do jednotlivých balení, měla by být opatřena alespoň čtyři balení, z nichž musí být odebrán alespoň jeden dílčí vzorek. Pokud se v jednotlivých případech prokáže, že opatřená balení pocházejí z různých šarží, musí být počet balení, z nichž mají být odebrány vzorky, snížen a omezen na balení pocházející z téže šarže. V případě analýzy vzorku prodeje na dálku na složky nebo látky, které jsou v krmivu rozloženy nerovnoměrně, musí být počet dílčích vzorků nejméně 2,5krát vyšší než u vzorků analyzovaných na látky rozložené v krmivu rovnoměrně.

Ze souhrnného vzorku se poté odeberou odpovídající konečné vzorky (pro účely kontroly, obhajoby a případně srovnání), pokud možno v souladu se zásadami stanovenými v bodě 9.4, a v protokolu o odběru vzorku se uvede, že se jedná o vzorek prodeje na dálku. Příslušný orgán poté o odběru vzorků neprodleně informuje provozovatele krmivářského podniku. Provozovateli krmivářského podniku se rovněž oznámí, že jeden vzorek (pro účely obhajoby) bude, pokud je to možné, pro jeho potřebu uchován příslušným orgánem na určeném místě pro účely obhajoby nebo se zašle provozovateli krmivářského podniku nebo se odešle do laboratoře určené provozovatelem krmivářského podniku v souladu s platnými vnitrostátními předpisy.

Je-li vzorek odeslán přímo do úřední laboratoře, musí být konečný vzorek připraven a zapečetěn v laboratoři osobami k tomu oprávněnými nebo za přítomnosti osob k tomu oprávněných. Protokol o odběru vzorku prodeje na dálku musí být zaslán neprodleně po vytvoření konečných vzorků příslušnému orgánu, který o odběru vzorků informuje provozovatele krmivářského podniku.

Má se za to, že množství dodané provozovatelem krmivářského podniku příslušnému orgánu představuje část šarže krmiva stejné třídy nebo popisu. V souladu s článkem 15 nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ([5]) platí, že pokud bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky EU, předpokládá se, a to i u vzorku prodeje na dálku, že všechno krmivo v dané šarži vykazuje stejné vlastnosti, pokud důkladné šetření (v příslušných případech během inspekce na místě) neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže nesplňuje požadavky EU.“

([5]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin (Úř. věst. L 31, 1.2.2002, s. 1).

PŘÍLOHA II

„PŘÍLOHA II

OBECNÁ USTANOVENÍ O METODÁCH ANALÝZY KRMIV

A. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO ANALÝZU

1. **Účel**

Postupy popsané v této příloze se týkají přípravy pro analýzu vzorků, které byly odeslány do kontrolních laboratoří po odběru v souladu s ustanoveními v příloze I.

Laboratorní vzorky musí být připraveny tak, aby byly navážky stanovené v metodách analýzy pro konečné vzorky homogenní a reprezentativní.

Kromě postupů popsaných v této příloze musí být dodrženy pokyny pro přípravu vzorku stanovené v normě EN ISO 6498.

2. **Předběžná opatření**

Postup přípravy vzorku, jímž je třeba se řídit, závisí na tom, které metody analýzy se mají použít a které složky nebo látky se mají kontrolovat. Proto je velmi důležité, aby byl příslušný postup přípravy vzorku vhodný pro použitou metodu analýzy a kontrolované složky nebo látky.

Veškeré nezbytné úkony musí být prováděny tak, aby se pokud možno zabránilo kontaminaci vzorku a změnám jeho složení.

Mletí, míchání a prosévání se provádí okamžitě při minimálním vystavení vzorku vlivům vzduchu a světla. Nesmí se používat mlýnky a drtiče, jež by mohly vzorek znatelně zahřát.

V případě krmiv, která jsou obzvláště citlivá na teplo, se doporučuje ruční drcení. Rovněž je třeba zajistit, aby zdrojem kontaminace nebyl samotný přístroj.

Homogenizace vzorku přípravou suspenze smícháním s vodou za vysokých otáček v některých případech prokazatelně poskytuje homogennější podvzorky než suchá homogenizace/mletí, zejména v případě nerovnoměrně rozložených chemických látek. Homogenizace pomocí dostatečného suchého mletí by však také mohla poskytnout homogenní podvzorky.

V některých případech, například pro stanovení obsahu námelu žitného, škodlivých botanických nečistot atd., nelze homogenizaci vzorku provést mletím, ale dostatečným promícháním vzorku.

Pokud nelze přípravu provést bez zásadních změn obsahu vlhkosti ve vzorku, stanoví se obsah vlhkosti před přípravou a po přípravě na základě metody uvedené v části A přílohy III.

3. **Postup**

3.1. *Obecný postup*

Zkoušená část se odebírá z konečného homogenizovaného vzorku. Dělení vzorku kvartací se nedoporučuje, protože zkoušené části vzniklé tímto dělením mohou být zatíženy velkou chybou.

3.1.1. Krmiva, která mohou být rozemleta ihned

— Konečný vzorek se promíchá a odebere do vhodné čisté a suché nádoby se vzduchotěsným uzávěrem. Opět se promíchá s cílem zajistit úplnou homogenizaci bezprostředně před odvážením množství pro analýzu (zkoušená část).

3.1.2. Krmiva, která mohou být rozemleta až po usušení

— Nestanoví-li metody analýzy jinak, konečný vzorek se suší tak dlouho, dokud se jeho obsah vlhkosti nesníží na úroveň 8 až 12 %, a sice postupem pro předsoušení popsaným v bodě 4.3 metody pro stanovení obsahu vlhkosti uvedené v části A přílohy III. Poté se postupuje podle bodu 3.1.1.

3.1.3. Tekutá nebo polotekutá krmiva

— Konečný vzorek se odebere do vhodné čisté a suché nádoby se vzduchotěsným uzávěrem. Důkladně se promíchá s cílem zajistit úplnou homogenizaci bezprostředně před odvážením množství pro analýzu (zkoušená část).

3.1.4. Ostatní krmiva

— Konečné vzorky, které nemohou být připraveny jedním z výše uvedených postupů, se upraví jakýmkoliv jiným postupem, který zajistí, že navážky pro analýzu (zkoušená část) budou pro konečné vzorky homogenní a reprezentativní.

3.2. *Zvláštní postup v případě vizuální prohlídky nebo zkoumání mikroskopem nebo v případě, že je celý souhrnný vzorek homogenizovaný*

— V případě vizuální prohlídky (bez použití mikroskopu) se ke zkoušce použije celý souhrnný nebo konečný vzorek.

— V případě zkoumání mikroskopem může laboratoř souhrnný vzorek zredukovat nebo takto redukovaný vzorek dále zredukovat. Konečné vzorky pro účely obhajoby a případně srovnání se odeberou postupem rovnocenným postupu odběru konečného vzorku pro účely vymahatelnosti.

— Pokud je celý souhrnný vzorek homogenizovaný, konečné vzorky se odeberou z homogenizovaného souhrnného vzorku.

— Pro stanovení obsahu námelu žitného a škodlivých botanických nečistot se konečný vzorek rozdělí na dva podvzorky o stejné hmotnosti přibližně 500 gramů. Vyšetří se jeden podvzorek. V případě, že je výsledek podvzorků roven 50 % (analytický práh) maximálního limitu nebo je nižší, je vzorek v souladu s maximálním limitem. Je-li výsledek vyšší než 50 % maximálního limitu, je třeba vyšetřit další podvzorek a pro kontrolu souladu s maximálním limitem se použije průměr výsledku z těchto dvou podvzorků.

4. **Skladování vzorků**

Vzorky musí být skladovány při takové teplotě, která nezmění jejich složení. Vzorky určené k analýze na obsah vitaminů nebo látek, které jsou obzvláště citlivé na světlo, se skladují tak, aby nedošlo k nepříznivému ovlivnění vzorku působením světla.

B. USTANOVENÍ O ČINIDLECH A PŘÍSTROJÍCH POUŽÍVANÝCH PŘI METODÁCH ANALÝZY

1. Nestanoví-li metody analýzy jinak, veškerá analytická činidla musí být analyticky čistá. Pokud se provádí analýza na stopové prvky, čistota činidel musí být zkontrolována slepou zkouškou. V závislosti na získaných výsledcích může být požadováno další čištění činidel.

2. U jakýchkoliv úkonů spojených s přípravou roztoků, ředěním, proplachováním nebo propíráním, které jsou uvedeny v metodách analýzy bez specifikace povahy použitého rozpouštědla nebo ředidla, se předpokládá, že musí být použita voda. Obecně platí, že se použije voda demineralizovaná nebo destilovaná. Ve zvláštních případech, které jsou uvedeny v metodách analýzy, se musí podrobit zvláštním postupům čištění.

3. Pokud jde o vybavení běžně používané v kontrolních laboratořích, uvádějí se v metodách analýzy pouze nástroje a přístroje, které jsou speciální nebo vyžadují zvláštní použití. Musí být čisté, a to zejména v případě, kdy je třeba stanovit velmi malá množství látek.

C. UPLATŇOVÁNÍ METOD ANALÝZY A VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

1. **Extrakční postup**

Některé metody vyžadují zvláštní extrakční postup. Obecně platí, že jiné extrakční postupy, než jsou postupy uvedené v dané metodě, mohou být použity jen pod podmínkou, že se prokáže, že použitý extrakční postup má na zkoušenou matrici rovnocennou extrakční účinnost jako postup uvedený v dané metodě.

2. **Postup čištění**

Některé metody vyžadují zvláštní postup čištění. Obecně platí, že jiné postupy čištění, než jsou postupy uvedené v dané metodě, mohou být použity jen pod podmínkou, že se prokáže, že použitý postup čištění vykazuje pro zkoušenou matrici rovnocenné výsledky analýzy jako postup uvedený v dané metodě.

3. **Počet stanovení**

Pokud je v případě analýzy na nežádoucí látky výsledek prvního stanovení výrazně (> 50 %) nižší než kontrolovaná specifikace, není zapotřebí žádných dalších stanovení, jestliže byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality. V ostatních případech je zapotřebí opakovaná analýza (druhé stanovení) pro vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného pomíchání vzorků. Pro další posouzení se použije střední hodnota těchto dvou stanovení.

Pokud jsou v případě kontroly minimálních nebo maximálních úrovní doplňkových látek výsledky prvního stanovení vyšší než minimální úroveň nebo nižší než maximální úroveň, není zapotřebí žádných dalších stanovení, jestliže byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality. V ostatních případech je zapotřebí opakovaná analýza (druhé stanovení) pro vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného pomíchání vzorků. Pro další posouzení se použije střední hodnota těchto dvou stanovení.

Pokud v případě kontroly deklarovaného obsahu látky nebo složky výsledek prvního stanovení potvrdí deklarovaný obsah, tj. jestliže výsledek analýzy spadá do přijatelného rozsahu odchylky od deklarovaného obsahu, není zapotřebí žádných dalších stanovení, jestliže byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality. V ostatních případech je zapotřebí opakovaná analýza (druhé stanovení) pro vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného pomíchání vzorků. Pro další posouzení se použije střední hodnota těchto dvou stanovení (průměrný výsledek analýzy spadá, nebo nespadá do přijatelného rozsahu odchylky od deklarovaného obsahu).

V některých případech je tento přijatelný rozsah odchylky vymezen v právních předpisech, např. v nařízení (ES) č. 767/2009 a nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/4 ([1]).

4. **Zpráva o použité metodě analýzy**

Použitá metoda analýzy se uvede do protokolu o analýze.

5. **Zpráva o výsledku analýzy**

Výsledek analýzy se vyjádří způsobem, který je stanoven v metodě analýzy, příslušným počtem platných číslic a v případě potřeby se koriguje na obsah vlhkosti v konečném vzorku před přípravou.

Většina regulačních limitů (např. maximální úroveň, minimální úroveň) v právních předpisech EU týkajících se krmiv je stanovena ve vztahu ke krmivu o obsahu vlhkosti 12 %. V těchto případech je proto za účelem posouzení výsledku analýzy naměřeného u vzorku vzhledem k regulačnímu limitu třeba výsledek analýzy nejprve vydělit obsahem sušiny ve vzorku (v %) vynásobeným 88, jak je uvedeno v tomto vzorci:

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

kde:

Mc: obsah vlhkosti ve vzorku (v %). 100 – Mc tedy představuje obsah sušiny ve vzorku (v %),

R_{ana}: výsledek analýzy naměřený u vzorku,

$R_{12\,\%}$: výsledek pro krmivo o obsahu vlhkosti 12 %; posoudí se s ohledem na regulační limit.

([1]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/4 ze dne 11. prosince 2018 o výrobě, uvádění na trh a používání medikovaných krmiv, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 a o zrušení směrnice Rady 90/167/EHS (Úř. věst. L 4, 7.1.2019, s. 1).

Dále musí být splněny tyto podmínky:

— výsledek analýzy je výrazně (> 50 %) nižší nebo vyšší než kontrolovaná informace/specifikace v označení (v závislosti na tom, zda informace/specifikace v označení představuje maximální nebo minimální úroveň),

— obsah vlhkosti ve vzorkovaném krmivu je znám a lze stanovit, že korekce na obsah vlhkosti dané posouzení nezmění,

pokud byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality a analýza slouží pouze pro účely kontroly souladu s právními předpisy, lze korekci na obsah vlhkosti vynechat (např. v případech, kdy neexistuje žádná specifikace nebo regulační limit), není-li to nezbytné pro interpretaci.

Je-li výsledek analýzy korigován na obsah vlhkosti, musí být stejným postupem korigována také odpovídající nejistota měření.

V případě stanovení obsahu námelu žitného nebo škodlivých botanických nečistot vizuálním/mikroskopickým zkoumáním není korekce na obsah vlhkosti nutná.

6. **Nejistota měření při analýze a výtěžnost v případě analýzy na nežádoucí látky**

Pokud jde o nežádoucí látky ve smyslu směrnice 2002/32/ES, považuje se produkt určený ke krmení za nevyhovující stanovenému maximálnímu obsahu, pokud se na základě výsledku analýzy jakožto střední hodnoty dvou nezávislých stanovení u krmiva o obsahu vlhkosti 12 % pokládá maximální obsah za překročený, přičemž se zohlední rozšířená nejistota měření při analýze a použije se koeficient rozšíření 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %, a korekce na výtěžnost. To znamená, že k posouzení souladu se použije analyzovaná koncentrace poté, co byla korigována na výtěžnost, a poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření při analýze. Tento postup se použije pouze v případech, kdy metoda analýzy umožňuje odhad rozšířené nejistoty měření při analýze a korekci na výtěžnost (nevyžaduje se např. v případě vizuálního/mikroskopického zkoumání).

Pokud výsledek analýzy vzorku odebraného pro účely obhajoby překročí maximální obsah (bez zohlednění rozšířené nejistoty měření při analýze), potvrzuje to nesoulad s kontrolním vzorkem, pokud v tomto ohledu neexistují zvláštní vnitrostátní předpisy.

Výsledek analýzy (pokud použitá metoda analýzy umožňuje odhad rozšířené nejistoty měření při analýze) se oznámí v této podobě:

a) je-li to vhodné a relevantní, musí být korigován na výtěžnost a případná korekce musí být uvedena. Výtěžnost musí být uvedena, pokud není součástí postupu vnitřní korekce na vychýlení, přičemž vychýlením se rozumí rozdíl mezi naměřenou hodnotou a referenční koncentrací. Korekce na výtěžnost není nutná v případě, že výtěžnost je v rozmezí 90–110 %;

b) ve tvaru „x +/– U“, kde „x“ je výsledek analýzy a „U“ je rozšířená nejistota měření při analýze s použitím koeficientu rozšíření 2 ([2]), který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %.

Pokud je však výsledek analýzy výrazně (> 50 %) nižší než kontrolovaná specifikace, a jestliže byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality a analýza slouží jen pro účely kontroly souladu s právními předpisy, lze zprávu o výtěžnosti a o rozšířené nejistotě měření při analýze vynechat (např. v případech, kdy neexistuje žádná specifikace nebo regulační limit), není-li nejistota měření nezbytná pro interpretaci.

7. **Nejistota měření při analýze a výtěžnost v případě analýzy obsahu doplňkových látek**

Za účelem kontroly dodržování povoleného minimálního a maximálního obsahu doplňkových látek se přítomnost doplňkové látky považuje za nevyhovující stanovenému minimálnímu a maximálnímu obsahu, pokud se na základě výsledku analýzy jakožto střední hodnoty dvou nezávislých stanovení u krmiva o obsahu vlhkosti 12 % pokládá:

([2]) Intervalu spolehlivosti ve výši 95 % lze dosáhnout i použitím jiného koeficientu, jako je t-rozdělení.

— maximální obsah za překročený, přičemž se zohlední rozšířená nejistota měření při analýze a korekce na výtěžnost. To znamená, že k posouzení souladu se použije analyzovaná koncentrace (tj. střední hodnota uvedených dvou stanovení) poté, co byla korigována na výtěžnost, a poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření při analýze,

— minimální obsah za nedosažený, přičemž se zohlední rozšířená nejistota měření při analýze a korekce na výtěžnost. To znamená, že k posouzení souladu se použije analyzovaná koncentrace (tj. střední hodnota uvedených dvou stanovení) poté, co byla korigována na výtěžnost, a poté, co byla přičtena rozšířená nejistota měření při analýze,

Pokud výsledek analýzy vzorku odebraného pro účely obhajoby překročí maximální obsah (bez zohlednění rozšířené nejistoty měření při analýze), potvrzuje to nesoulad s kontrolním vzorkem, pokud v tomto ohledu neexistují zvláštní vnitrostátní předpisy.

Výsledek analýzy (pokud použitá metoda analýzy umožňuje odhad rozšířené nejistoty měření při analýze) se oznámí v této podobě:

a) je-li to vhodné a relevantní, musí být korigován na výtěžnost a případná korekce musí být uvedena. Výtěžnost musí být uvedena, pokud není součástí postupu vnitřní korekce na vychýlení, přičemž vychýlením se rozumí rozdíl mezi naměřenou hodnotou a referenční koncentrací. Korekce na výtěžnost není nutná v případě, že výtěžnost je v rozmezí 90–110 %;

b) ve tvaru „x +/– U“, kde „x“ je výsledek analýzy (střední hodnota uvedených dvou stanovení) a „U“ je rozšířená nejistota měření při analýze s použitím koeficientu rozšíření 2 ([3]), který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %.“

([3]) Intervalu spolehlivosti ve výši 95 % lze dosáhnout i použitím jiného koeficientu, jako je t-rozdělení.

PŘÍLOHA III

„PŘÍLOHA III

METODY ANALÝZY PRO KONTROLU SLOŽENÍ KRMNÝCH SUROVIN A KRMNÝCH SMĚSÍ

A. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vlhkosti v krmivech. V případě, že krmivo obsahuje těkavé látky, např. organické kyseliny, je třeba zohlednit, že spolu s obsahem vlhkosti se stanoví i značné množství těkavých látek.

Tato metoda se nevztahuje na analýzu mléčných výrobků jako krmných surovin a krmných směsí, které jsou tvořeny převážně mléčnými výrobky, analýzu živočišných a rostlinných tuků a olejů ani na analýzu olejnatých semen a plodů.

Stanovení obsahu vlhkosti v olejnatých semenech se stanoví metodou uvedenou v normě EN ISO 665 (Stanovení vlhkosti a obsahu těkavých látek) s tím, že sójové boby musí být před stanovením obsahu vlhkosti rozemlety.

2. **Princip**

Vzorek se suší za předepsaných podmínek, které závisejí na druhu krmiva. Úbytek hmotnosti se stanoví vážením. U pevných krmiv s vysokým obsahem vlhkosti je nutné provést předsoušení.

3. **Přístroje**

3.1. Laboratorní mlýnek z materiálu, který neabsorbuje vlhkost, snadno se čistí, umožňuje rychlé a rovnoměrné rozemletí, aniž by došlo ke znatelnému ohřevu, pokud možno zabraňuje kontaktu s okolním vzduchem a odpovídá požadavkům uvedeným v bodech 4.1.1 a 4.1.2 (např. úderové křížové mikromlýnky, vodou chlazené mikromlýnky, rozebíratelné kuželové mlýnky, mlýnky s pomalým chodem a drtiče s ozubenými kolečky).

3.2. Analytická váha s přesností na 1 mg.

3.3. Vysoušečky z nekorodujícího kovu nebo ze skla se vzduchotěsně uzavíratelnými víčky; užitková plocha umožňující rozprostření 0,3 g zkušebního vzorku na jeden cm^2.

3.4. Elektricky vyhřívaná izotermická sušárna (± 2 °C), která zaručuje rychlou regulaci teploty a je vybavena kvalitním větráním ([1]).

3.5. Elektricky vyhřívaná vakuová sušárna s regulací teploty a olejovým čerpadlem, která je vybavena buď zařízením pro přívod teplého a suchého vzduchu, nebo vysoušecím prostředkem (např. oxidem vápenatým).

3.6. Exsikátor se silnou perforovanou deskou z kovu nebo porcelánu, který obsahuje účinný vysoušecí prostředek.

4. **Postup**

Poznámka: Úkony uvedené v tomto bodě musí být provedeny ihned po otevření obalů vzorků. Analýza musí být provedena nejméně dvakrát.

([1]) Sušárna určená pro sušení obilí, mouky, krup a krupice musí mít takovou tepelnou kapacitu, aby, pokud je nastavena na teplotu 131 °C, této teploty opět dosáhla v době kratší než 45 minut poté, co byl do sušárny umístěn maximální počet zkušebních vzorků, které se mají sušit současně. Větrání musí být takové, že když se všechny vzorky pšenice obecné, které může sušárna pojmout, současně suší po dobu dvou hodin, vykazují ve srovnání s výsledky čtyřhodinového sušení rozdíl, který je nižší než 0,15 %.

4.1. *Příprava*

4.1.1. Krmiva jiná než krmiva uvedená v bodech 4.1.2 a 4.1.3

Odebere se minimálně 50 g vzorku. Pokud je to nutné, vzorek se rozdrtí nebo rozmělní takovým způsobem, aby nedošlo ke změně obsahu vlhkosti (viz bod 6).

4.1.2. Obiloviny a kroupy

Odebere se minimálně 50 g vzorku. Toto množství se rozemele tak, aby alespoň 50 % částic prošlo sítem s oky o velikosti 0,5 mm a zbytek na sítě s kulatými oky o velikosti 1 mm činil maximálně 10 %.

4.1.3. Tekutá nebo pastovitá krmiva a krmiva, která jsou složena převážně z olejů a tuků

Odebere se přibližně 25 g vzorku s přesností na 10 mg, smíchá se s odpovídajícím množstvím předem vysušeného písku zváženého s přesností na 10 mg, až vznikne homogenní hmota.

4.2. *Sušení*

Vysoušečka (bod 3.3) s víčkem se suší v sušárně nastavené na 103 °C po dobu 30 minut ± 1 min. Ze sušárny se poté vytáhne a nechá se vychladnout na teplotu okolí v exsikátoru (bod 3.6).

4.2.1. Krmiva jiná než krmiva uvedená v bodech 4.2.2 a 4.2.3

Vysoušečka s víčkem se zváží s přesností na 1 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží přibližně 5 g vzorku s přesností na 1 mg a rovnoměrně se rozprostře. Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do sušárny předehřáté na 103 °C. Aby se zabránilo nežádoucímu poklesu teploty, je třeba vložit vysoušečku do sušárny co nejrychleji. Sušení probíhá čtyři hodiny, přičemž doba sušení se počítá od okamžiku, kdy teplota v sušárně opět dosáhla 103 °C. Po otevření vakuové laboratorní sušárny se vysoušečka ihned opět uzavře víčkem, vyjme ze sušárny, nechá vychladnout 30–45 minut v exsikátoru (bod 3.6) a nakonec se zváží s přesností na 1 mg.

U krmiv, která se převážně (> 50 %) skládají z olejů a tuků živočišného a rostlinného původu, se suší v sušárně ještě dalších 30 minut při teplotě 103 °C. Rozdíl mezi těmito dvěma váženími nesmí být větší než 0,1 % vlhkosti.

4.2.2. Obiloviny, mouka, kroupy a krupice

Vysoušečka s víčkem se zváží s přesností na 0,5 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží přibližně 5 g rozdrceného vzorku s přesností na 1 mg a rovnoměrně se rozprostře. Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do sušárny předehřáté na 130 °C. Aby se zabránilo nežádoucímu poklesu teploty, je třeba vložit vysoušečku do sušárny co nejrychleji. Sušení probíhá dvě hodiny, přičemž doba sušení se počítá od okamžiku, kdy teplota v sušárně opět dosáhla 130 °C. Po otevření vakuové laboratorní sušárny se vysoušečka ihned opět uzavře víčkem, vyjme ze sušárny, nechá vychladnout 30–45 minut v exsikátoru (bod 3.6) a nakonec se zváží s přesností na 1 mg.

4.2.3. Krmné směsi obsahující více než 4 % sacharózy nebo laktózy: krmné suroviny jako svatojánský chléb, hydrolyzované produkty z obilovin, sladový květ, sušené cukrovarnické řízky, rybí a cukerný vývar

Vysoušečka s víčkem se zváží s přesností na 0,5 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží přibližně 5 g vzorku s přesností na 1 mg a rovnoměrně se rozprostře. Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do vakuové sušárny (bod 3.5) předehřáté na 80–85 °C. Aby se zabránilo nežádoucímu poklesu teploty, je třeba vložit vysoušečku do sušárny co nejrychleji.

Tlak se upraví na 100 torrů a vzorek se suší při tomto tlaku čtyři hodiny buď pomocí přívodu horkého a suchého vzduchu, nebo pomocí vysoušecího prostředku (přibližně 300 g na 20 vzorků). V tomto druhém případě se přeruší spojení s vakuovou pumpou, jakmile bylo dosaženo předepsaného tlaku. Doba sušení se počítá od okamžiku, kdy bylo v sušárně opět dosaženo teploty 80–85 °C. Potom se tlak v sušárně opatrně upraví zpět na atmosférický tlak. Po otevření vakuové laboratorní sušárny se vysoušečka ihned opět uzavře víčkem, vyjme ze sušárny, nechá vychladnout 30–45 minut v exsikátoru (bod 3.6) a nakonec se zváží s přesností na 1 mg. Vysoušečka se suší dalších 30 minut ve vakuové sušárně při teplotě 80–85 °C a znovu se zváží. Rozdíl mezi těmito dvěma váženími nesmí být větší než 0,1 % vlhkosti.

4.3. *Předsoušení (částečné sušení)*

Před jemným mletím je nezbytné „vlhká“ krmiva s hmotnostním podílem nižším než 85 % sušiny (např. pícniny, směsné krmné dávky, (ne)tekutá krmiva) částečně vysušit, aby bylo možné analyzovat jejich stabilní látky; u nestabilních látek není částečné sušení možné.

Částečné sušení lze provést buď za použití sušárny s nucenou cirkulací vzduchu či mikrovlnné sušárny, nebo mrazovým sušením. S výjimkou částečného sušení mrazovým sušením je cílem vysušit krmivo při zachování teploty vzorku pod 60 °C, aby bylo chemické složení co nejméně ovlivněno. Sušení při teplotách vyšších než 60 °C způsobuje chemické změny v krmivu (např. rozklad bílkovin). Vysušené krmivo se před měřením částečného obsahu sušiny nechá ekvilibrovat při laboratorní teplotě po dobu přibližně 15 minut, aby se minimalizovala potenciální změna vlhkosti, k níž může dojít při mletí a skladování. Sušením při teplotách nižších než 60 °C se z krmiva neodstraní veškerá voda; (počáteční) částečné sušení proto nepředstavuje celkovou sušinu daného krmiva. Po sušení se podvzorek rozemele a analyzuje se na (konečnou) sušinu částečně sušeného vzorku (zbývající 3 % až 15 % vlhkosti), pokud se stanovují jiné chemické složky.

Proto se pro stanovení obsahu sušiny doporučuje dvoufázový postup. Nejprve se stanoví částečný obsah sušiny (pokud se jedná o méně než 85 % sušiny), poté se stanoví obsah zbývající sušiny na rozemletém zkušebním vzorku a částečný obsah sušiny se vynásobí obsahem zbývající sušiny, aby se stanovil celkový obsah sušiny.

5. **Výpočet výsledků**

Obsah vlhkosti (X) jako procento vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

5.1. *Sušení bez předsoušení*

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

kde:

m = počáteční hmotnost zkušebního vzorku v gramech,

m_0 = hmotnost sušeného zkušebního vzorku v gramech.

5.2. *Sušení s předsoušením* ([2])

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

kde:

m = počáteční hmotnost zkušebního vzorku v gramech,

m_1 = hmotnost zkušebního vzorku po předsoušení v gramech,

m_2 = hmotnost zkušebního vzorku po rozdrcení nebo rozemletí v gramech,

m_0 = hmotnost sušeného zkušebního vzorku v gramech.

([2]) Podrobnější informace o výpočtu jsou uvedeny v normě EN ISO 6498 – Krmiva – Pokyny pro přípravu vzorku.

5.3. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 0,2 % absolutní hodnoty vlhkosti, s výjimkou vlhkého krmiva pro zvířata v zájmovém chovu a žvýkacích pamlsků pro psy, kde rozdíl nesmí překročit 0,5 % absolutní hodnoty vlhkosti.

6. **Poznámka**

Pokud je nutné vzorek rozdrtit a pokud se na základě toho musí počítat se změnou obsahu vlhkosti produktu, je nutno korigovat výsledky analýzy jednotlivých složek krmiva podle obsahu vlhkosti vzorku v jeho původním stavu.

B. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V ŽIVOČIŠNÝCH A ROSTLINNÝCH TUCÍCH A OLEJÍCH

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vody a těkavých látek v živočišných a rostlinných tucích a olejích.

2. **Princip**

Vzorek se vysuší do konstantní hmotnosti při 103 °C (úbytek hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími musí být maximálně 1 mg). Úbytek hmotnosti se stanoví vážením.

3. **Přístroje**

3.1. Miska s plochým dnem z nekorodujícího materiálu o průměru 8–9 cm a výšce přibližně 3 cm.

3.2. Rtuťový teploměr se zesílením na vrcholu a expanzní trubicí na horním konci, se stupnicí přibližně od 80 °C alespoň do 110 °C, přibližně 10 cm dlouhý.

3.3. Písková lázeň nebo elektrická topná deska.

3.4. Exsikátor s účinným vysoušecím prostředkem.

3.5. Analytické váhy.

4. **Postup**

Do misky (bod 3.1), předem vysušené a zvážené, opatřené teploměrem (bod 3.2) se naváží přibližně 20 g homogenizovaného vzorku s přesností na 1 mg. Zahřívá se na pískové lázni nebo na topné desce (bod 3.3) za stálého promíchávání teploměrem tak, aby teplota během asi 7 minut dosáhla 90 °C.

Zahřívání se sníží a sleduje se intenzita tvorby bublin, které stoupají ode dna misky. Teplota nesmí přesáhnout 105 °C. V důkladném míchání ode dna misky se pokračuje, dokud se nepřestanou tvořit bubliny.

Během zahřívání se vzorek několikrát zahřeje na 103 ± 2 °C a ochladí na 93 °C, aby se zajistilo úplné odstranění vlhkosti. Poté se nechá vychladnout na laboratorní teplotu v exsikátoru (bod 3.4) a zváží se. Tento postup se opakuje, dokud není dosaženo úbytku hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími nepřesahujícího 2 mg.

Poznámka: Zvýšení hmotnosti vzorku po opakovaném zahřívání je způsobeno oxidací tuku; v tomto případě se výsledek vypočte z vážení provedeného bezprostředně před tím, než se hmotnost začala zvyšovat.

5. **Výpočet výsledků**

Obsah vlhkosti (X) jako procento vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

m = hmotnost zkušebního vzorku v gramech,

m_1 = hmotnost misky s obsahem před ohřevem v gramech,

m_2 = hmotnost misky s obsahem po ohřevu v gramech.

Výsledky nižší než 0,05 % musí být uváděny jako „nižší než 0,05 %“.

Opakovatelnost

Rozdíl ve vlhkosti mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 0,1 % v absolutní hodnotě.

C. STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU A VÝPOČET OBSAHU HRUBÉHO PROTEINU

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu hrubého proteinu v krmivech na základě stanovení obsahu dusíku podle Kjeldahlovy metody ([3]).

2. **Princip**

Vzorek se mineralizuje kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru. Kyselý roztok se alkalizuje roztokem hydroxidu sodného. Amoniak se vydestiluje a jímá se do odměřeného množství kyseliny sírové a přebytek se titruje standardním roztokem hydroxidu sodného.

Uvolněný amoniak se případně vydestiluje do přebytku roztoku kyseliny borité a následně se titruje roztokem kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové.

3. **Činidla**

3.1. Síran draselný.

3.2. Katalyzátor: oxid měďnatý (CuO) nebo síran měďnatý, pentahydrát ($CuSO_4$ $5H_2O$).

3.3. Granulovaný zinek.

3.4. Kyselina sírová, $\rho 20$ = 1,84 g/ml.

3.5. Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H_2SO_4) = 0,25 mol/l.

3.6. Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H_2SO_4) = 0,10 mol/l.

3.7. Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H_2SO_4) = 0,05 mol/l.

3.8. Indikátor methylčerveň: 300 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu, σ = 95–96 % (v/v).

3.9. Roztok hydroxidu sodného (může být použit technicky čistý), β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10. Hydroxid sodný, standardní odměrný roztok, c(NaOH) = 0,25 mol/l.

3.11. Hydroxid sodný, standardní odměrný roztok, c(NaOH) = 0,10 mol/l.

3.12. Granulovaná pemza, praná v kyselině chlorovodíkové a vysušená.

3.13. Acetanilid (bod tání = 114 °C, obsah N = 10,36 %).

3.14. Sacharóza (dusíku prostá).

3.15. Kyselina boritá (H_3BO_3).

([3]) Obsah dusíku lze stanovit ve všech krmivech, avšak přepočítací koeficient 6,25 pro výpočet obsahu hrubého proteinu nemusí být použitelný pro krmné suroviny z hmyzu (nižší přepočítací koeficient) a některé krmivo pro zvířata v zájmovém chovu a bílkoviny krevní plazmy (vyšší přepočítací koeficient).

3.16. Indikátorový roztok methylčerveně: 100 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu nebo methanolu.

3.17. Roztok bromokresolové zeleně: 100 mg bromokresolové zeleně se rozpustí ve 100 ml ethanolu nebo methanolu.

3.18. Roztok kyseliny borité (10 g/l až 40 g/l v závislosti na použitém přístroji)

Pokud se použije kolorimetrická detekce koncového bodu, do roztoků kyseliny borité se musí přidat indikátory methylčerveň a bromokresol. Pokud se připravuje 1 litr roztoku kyseliny borité, před úpravou objemu se přidá 7 ml i indikátorového roztoku methylčerveně (bod 3.16) a 10 ml roztoku bromokresolové zeleně (bod 3.17).

V závislosti na použité vodě se může pH jednotlivých roztoků kyseliny borité u různých šarží lišit. pH roztoku kyseliny borité musí být mezi 4,3 a 4,7. Často je nezbytná úprava pomocí malého množství zásadité látky, aby se získal pozitivní slepý vzorek.

Poznámka: Přidání 3–4 ml NaOH (bod 3.11) do 1 litru roztoku kyseliny borité s koncentrací 10 g/l obvykle představuje vhodnou úpravu. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě a během skladování musí být chráněn před světlem a zdrojem amoniakových výparů.

3.19. Kyselina chlorovodíková, standardní odměrný roztok, c(HCl) = 0,10 mol/l.

Poznámka: Lze použít i jiné koncentrace odměrných roztoků (body 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 a 3.19), pokud je tato skutečnost korigována ve výpočtech. Koncentrace se vždy vyjadřují s přesností na čtyři desetinná místa.

4. Přístroje

Přístroje vhodné pro provedení mineralizace, destilace a titrace podle Kjeldahlovy metody.

5. Postup

5.1. *Mineralizace*

Do mineralizační baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 15 g síranu draselného (bod 3.1) a vhodné množství katalyzátoru (bod 3.2) (0,3–0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9–1,2 g síranu měďnatého, pentahydrátu, 25 ml kyseliny sírové (bod 3.4) a, pokud je třeba, několik granulí pemzy (bod 3.12) a zamíchá se.

Baňka se zahřívá nejprve mírně a podle potřeby se občas zamíchá, dokud nedojde ke zuhelnatění hmoty a neustane pěnění; potom se intenzita zahřívání zvyšuje, dokud se kapalina ustáleně nevaří. Zahřívání je odpovídající, pokud vroucí kyselina kondenzuje na stěnách baňky. Nesmí docházet k přehřívání stěn baňky a k ulpívání organických částic na stěnách baňky.

Jakmile se roztok stane čirým a získá světle zelené zabarvení, pokračuje se v ohřevu ještě dvě hodiny a potom se ponechá vychladnout.

5.2. *Destilace*

Opatrně se přidá tolik vody, aby došlo k úplnému rozpuštění sulfátů. Nechá se vychladnout a potom se přidá několik granulí zinku (bod 3.3), pokud je třeba. Dále se postupuje podle bodu 5.2.1 nebo 5.2.2.

5.2.1. Destilace do kyseliny sírové

Do předlohy destilačního zařízení se odměří přesně 25 ml kyseliny sírové (bod 3.5) nebo (bod 3.7) podle předpokládaného obsahu dusíku. Přidá se několik kapek indikátoru methylčerveň (bod 3.8).

Mineralizační baňka se připojí ke kondenzátoru destilačního přístroje a konec kondenzátoru se ponoří do kapaliny v předloze do hloubky nejméně 1 cm (viz poznámka v bodě 8.3). Do mineralizační baňky se zvolna přilije 100 ml roztoku hydroxidu sodného (bod 3.9) tak, aby nedošlo ke ztrátám amoniaku (viz poznámka v bodě 8.1). Baňka se zahřívá, dokud se nepředestiluje veškerý amoniak.

5.2.2. Destilace do kyseliny borité

V případě manuální titrace amoniakového obsahu destilátu se použije níže popsaný postup. Pokud je destilační jednotka plně automatická a zahrnuje titraci amoniakového obsahu destilátu, dodrží se pokyny výrobce pro provoz destilační jednotky.

Předloha s obsahem 25–30 ml roztoku kyseliny borité (bod 3.18) se umístí pod otvor kondenzátoru tak, že jeho vývod je ponořen pod hladinu přebytku roztoku kyseliny borité. Destilační jednotka se upraví na dávkování 50 ml roztoku hydroxidu sodného (bod 3.9). S destilační jednotkou se pracuje podle pokynů výrobce a oddestiluje se amoniak uvolněný přidáním roztoku hydroxidu sodného. Destilát se jímá do roztoku kyseliny borité. Množství destilátu (doba destilace párou) závisí na množství dusíku ve vzorku. Je třeba dodržet pokyny výrobce.

Poznámka: V poloautomatické destilační jednotce se doplnění přebytku hydroxidu sodného a destilace párou provádí automaticky.

5.3. *Titrace*

Dále se postupuje podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2.

5.3.1. Kyselina sírová

Přebytek kyseliny sírové v předloze se titruje roztokem hydroxidu sodného (bod 3.10 nebo 3.11) podle použité koncentrace kyseliny sírové do dosažení koncového bodu.

5.3.2. Kyselina boritá

Obsah předlohy se titruje se standardním odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (bod 3.19) nebo se standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (bod 3.6) s použitím byrety a odečte se množství použitého titračního činidla.

Pokud se použije kolorimetrická detekce koncového bodu, je koncového bodu dosaženo při prvním zbarvení obsahu do růžova. Odečte se objem byretou s přesností na 0,05 ml. Koncový bod může být zřetelnější při použití osvětlené desky magnetické míchačky nebo fotometrického detektoru.

Lze provést automaticky s použitím parního destilátoru s automatickou titrací.

Je třeba dodržet pokyny výrobce pro provoz konkrétního destilačního přístroje nebo destilačního/titračního přístroje.

Poznámka: Při použití automatického titračního systému začíná titrace ihned po zahájení destilace a použije se 1 % roztok kyseliny borité (bod 3.18).

Při použití plně automatické destilační jednotky lze automatickou titraci amoniaku provést rovněž pomocí detekce koncového bodu s použitím potenciometrického systému pH.

V tomto případě se použije automatický titrační přístroj s pH metrem. pH metr je správně kalibrován v rozsahu pH 4–7 podle běžných laboratorních postupů pro kalibraci pH.

Takto bude pH koncového bodu titrace dosaženo při hodnotě pH 4,6, přičemž se jedná o nejstrmější skok na titrační křivce (inflexní bod).

5.4. *Slepá zkouška*

Pro potvrzení, že všechna použitá činidla jsou prostá dusíku, se provede slepá zkouška (mineralizace, destilace a titrace) s 1 g sacharózy (bod 3.14) místo vzorku.

6. **Výpočet výsledků**

Výpočet se provede podle bodu 6.1 nebo 6.2.

6.1. *Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.1*

Obsah hrubého proteinu vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

V_0 = spotřeba NaOH (bod 3.10 nebo 3.11) na slepou zkoušku v ml,

V_1 = spotřeba NaOH (bod 3.10 nebo 3.11) na titraci vzorku v ml,

c = koncentrace hydroxidu sodného (bod 3.10 nebo 3.11) v mol/l,

m = hmotnost vzorku v g.

6.2. *Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.2*

6.2.1. Titrace kyselinou chlorovodíkovou

Obsah hrubého proteinu vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

m = hmotnost navážky vzorku v g,

c = koncentrace standardního odměrného roztoku hydroxidu sodného (bod 3.19) v mol/l,

V_0 = spotřeba kyseliny chlorovodíkové na slepou zkoušku v ml,

V_1 = spotřeba kyseliny chlorovodíkové na navážku vzorku v ml.

6.2.2. Titrace kyselinou sírovou

Obsah hrubého proteinu vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

m = hmotnost navážky vzorku v g,

c = koncentrace standardního odměrného roztoku kyseliny sírové (bod 3.6) v mol/l,

V_0 = spotřeba kyseliny sírové (bod 3.6) na slepou zkoušku v ml,

V_1 = spotřeba kyseliny sírové (bod 3.6) na navážku vzorku v ml.

7. **Verifikace metody**

7.1. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit:

— 0,4 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubého proteinu do 20 %,

— 2,0 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu hrubého proteinu od 20 % do 40 %,

— 0,8 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubého proteinu nad 40 %.

7.2. *Reprodukovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v různých laboratořích nesmí překročit:

— 1,8 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubého proteinu do 20 %,

— 9,0 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu hrubého proteinu od 20 % do 40 %,

— 3,6 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubého proteinu nad 40 %.

7.3. *Přesnost*

Provede se analýza (mineralizace, destilace a titrace) vhodného množství acetanilidu (bod 3.13) (např. 0,2 až 0,3 g) za přítomnosti 1 g sacharózy (bod 3.14); spotřeba kyseliny sírové (bod 3.5) na 1 g acetanilidu je 14,80 ml. Výtěžnost musí být nejméně 99 %.

8. **Poznámky**

8.1. Přístroje mohou být manuální, poloautomatické nebo automatické. Pokud přístroj vyžaduje převod mezi mineralizačním a destilačním krokem, musí být tento krok proveden beze ztrát. Pokud k baňce destilačního přístroje není připojena přikapávací nálevka, přilévá se hydroxid sodný opatrně po stěně bezprostředně před připojením baňky ke kondenzátoru.

8.2. Pokud mineralizát po zchladnutí ztuhne, opakuje se stanovení s větším množstvím kyseliny sírové (bod 3.4), než je uvedeno v bodě 5.1.

8.3. U produktů s nízkým obsahem dusíku může být objem kyseliny sírové (bod 3.7) v případě potřeby snížen na 10 nebo 15 ml a doplní se vodou na objem 25 ml.

8.4. Pro rutinní analýzu lze pro stanovení hrubého proteinu použít alternativní metody analýzy, referenční metodou je však Kjeldahlova metoda popsaná v této části C. Rovnocennost výsledků získaných alternativní metodou (např. DUMAS) ve srovnání s referenční metodou musí být prokázána pro každou matrici zvlášť. Jelikož výsledky získané alternativní metodou se mohou i v případě ověření rovnocennosti nepatrně odchylovat od výsledků získaných referenční metodou, je zapotřebí uvést v protokolu o analýze metodu analýzy použitou pro stanovení hrubého proteinu.

D. STANOVENÍ OBSAHU MOČOVINY

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu močoviny použité jako doplňková látka v krmivech pro přežvýkavce.

2. **Princip**

Vzorek s čeřicím činidlem se rozmíchá ve vodě. Suspenze se přefiltruje. Obsah močoviny ve filtrátu se stanoví po přidání 4-dimethylaminobenzaldehydu (4-DMAB) měřením optické hustoty při vlnové délce 420 nm.

3. **Činidla**

3.1. Roztok 4-dimethylaminobenzaldehydu: 1,6 g 4-DMAB se rozpustí v 100 ml 96 % ethanolu a přidá se 10 ml kyseliny chlorovodíkové (ρ_{20} 1,19 g/ml). Skladovatelnost tohoto činidla je nejvýše dva týdny.

3.2. Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.

3.3. Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g hexakyanidoželeznatanu draselného $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Doplní se vodou na 100 ml.

3.4. Aktivní uhlí, které neabsorbuje močovinu (musí být ověřeno).

3.5. Močovina, 0,1 % roztok (w/v).

4. **Přístroje**

4.1. Míchací zařízení: přibližně 35 až 40 ot/min.

4.2. Zkumavky: 160 × 16 mm se skleněnou zábrusovou zátkou.

4.3. Spektrofotometr.

5. **Postup**

5.1. *Analýza vzorku*

Do 500 ml odměrné baňky se naváží 2 g vzorku s přesností na 1 mg a přidá se 1 g aktivního uhlí (bod 3.4). Přidá se 400 ml vody a 5 ml Carrezova činidla I (bod 3.2), míchá se po dobu přibližně 30 sekund a přidá se 5 ml Carrezova činidla II (bod 3.3). Míchá se po dobu 30 minut na míchacím zařízení. Doplní se vodou po značku, protřepe se a přefiltruje.

Do zkumavek se skleněnými zábrusovými zátkami se odpipetuje 5 ml čirého, bezbarvého filtrátu, přidá se 5 ml roztoku 4-DMAB (bod 3.1) a promíchá. Zkumavky se vloží do vodní lázně nastavené na teplotu 20 °C (± 4 °C). Po patnácti minutách se změří optická hustota roztoku vzorku na spektrofotometru při vlnové délce 420 nm. Porovná se slepou zkouškou roztoku činidel.

5.2. *Kalibrační křivka*

Do odměrných baněk na 100 ml se napipetuje 1, 2, 4, 5 a 10 ml roztoku močoviny (bod 3.5) a doplní se po značku vodou. Z těchto roztoků se odpipetuje 5 ml, ke každému se přidá 5 ml roztoku 4-DMAB (bod 3.1), homogenizuje se a změří se optická hustota, jak je uvedeno výše, a porovná s kontrolním roztokem obsahujícím 5 ml 4-DMAB a 5 ml vody bez močoviny. Sestaví se kalibrační křivka.

6. **Výpočet výsledků**

Stanoví se množství močoviny ve vzorku s použitím kalibrační křivky.

Výsledek se vyjádří v mg močoviny na kg vzorku.

7. **Evaluace metody**

7.1. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v téže laboratoři a týmž laborantem nesmí překročit:

— při 420 nm

  — 50 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny od 3 000 mg/kg do méně než 5 000 mg/kg,

  — 25 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny od 5 000 mg/kg do méně než 7 000 mg/kg,

  — 20 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny 7 000 mg/kg či více,

— při 435 nm

  — 40 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny od 3 000 mg/kg do méně než 5 000 mg/kg,

  — 25 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny od 5 000 mg/kg do méně než 9 000 mg/kg,

  — 5 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny 9 000 mg/kg či více.

7.2. *Reprodukovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v různých laboratořích a/nebo různými laboranty nesmí překročit:

— při 420 nm

  — 3 000 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahu močoviny od 3 000 mg/kg do méně než 12 000 mg/kg,

  — 4 500 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahu močoviny 12 000 mg/kg či více,

— při 435 nm

  — 50 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny od 3 000 mg/kg do méně než 8 000 mg/kg,

  — 25 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu močoviny 8 000 mg/kg či více.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

V EU bylo provedeno mezilaboratorní srovnání, jehož se zúčastnilo 18 laboratoří. Pět pozitivních vzorků krmných směsí pro přežvýkavce (v tabulkách 1 a 2 označených jako MAT) bylo analyzováno (jedna analýza) v slepých duplikátech a jeden slepý vzorek krmné směsi pro přežvýkavce byl analyzován jednou.

Výpočty mezních hodnot opakovatelnosti (r) a reprodukovatelnosti (R), jak jsou vymezeny v mezinárodních pokynech, byly provedeny po vyloučení odlehlých hodnot pomocí analýzy rozptylu platných hodnot.

Vypočtené hodnoty účinnosti metody (opakovatelnost, reprodukovatelnost) jsou uvedeny v tabulkách níže. U všech zkušebních vzorků včetně slepého vzorku nebyly zjištěny žádné falešně pozitivní ani falešně negativní výsledky.

Tabulka 1

Charakteristiky účinnosti metody pro močovinu měřené při λ = 420 nm ve všech materiálech

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Skot	Ovce	Ovce	Skot
Cílový hmotnostní podíl (mg kg $^{-1}$)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Průměrný hmotnostní podíl (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Směrodatná odchylka opakovatelnosti s_r (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Mezní hodnota reprodukovatelnosti R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Mezní hodnota opakovatelnosti r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabulka 2

Charakteristiky účinnosti metody pro močovinu měřené při λ = 435 nm ve všech materiálech

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Skot	Ovce	Ovce	Skot
Cílový hmotnostní podíl (mg kg $^{-1}$)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Průměrný hmotnostní podíl (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Směrodatná odchylka opakovatelnosti s_r (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167

Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Mezní hodnota reprodukovatelnosti R [$R = 2{,}8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Mezní hodnota opakovatelnosti r [$r = 2{,}8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. **Poznámky**

9.1. V případě, že vzorek obsahuje více než 3 % močoviny, se vzorek zredukuje na 1 g nebo se původní roztok zředí tak, aby v něm nebylo více než 50 mg močoviny na 500 ml roztoku.

9.2. V případě nízkého obsahu močoviny se vzorek zvětšuje tak dlouho, až je filtrát čirý a bezbarvý.

9.3. Výše uvedené výsledky z kolaborativních zkoušek nenaznačují významný rozdíl v preciznosti mezi močovinou měřenou při 420 nm nebo při 435 nm.

E. STANOVENÍ OBSAHU AMINOKYSELIN (KROMĚ TRYPTOFANU)

Metody analýzy, které se mají použít pro stanovení obsahu aminokyselin (kromě tryptofanu), jsou:

— EN ISO 13903 Krmiva – Stanovení obsahu aminokyselin,

— EN ISO 17180 Krmiva – Stanovení lyzinu, methioninu a threoninu v komerčně dostupných výrobcích a premixech obsahujících aminokyseliny ([4]),

— metoda analýzy popsaná v bodech 1 až 10 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu volných (syntetických a přírodních) a celkových (na peptidy vázaných a volných) aminokyselin v krmných surovinách, krmných směsích a premixech obsahujících méně než 10 % ([5]) každé aminokyseliny za použití analyzátoru aminokyselin. Metoda je použitelná pro tyto aminokyseliny: cyst(e)in, methionin, lysin, threonin, alanin, arginin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, glycin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, serin, tyrosin a valin.

Tato metoda nerozlišuje mezi jednotlivými solemi aminokyselin a neumožňuje také u aminokyselin rozlišovat mezi formami D a L. Není použitelná pro stanovení tryptofanu nebo hydroxyanalogů aminokyselin.

2. **Princip**

2.1. *Volné aminokyseliny*

Volné aminokyseliny se extrahují zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Současně extrahované dusíkaté makromolekuly se vysráží kyselinou sulfosalicylovou a odstraní se filtrací. Přefiltrovaný roztok se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují ionexovou chromatografií a stanoví se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm.

([4]) Metoda analýzy stanovená v normě EN 17180 se označuje jako alternativní metoda, která se má použít pro účely úřední kontroly ke stanovení obsahu aminokyselin v krmivech obsahujících více než 10 % aminokyselin.

([5]) Tato metoda nebyla validována na základě kolaborativní zkoušky pro premixy obsahující více než 10 % doplňkových látek. Je však použitelná i na tyto matrice s vhodnými drobnými úpravami za předpokladu, že je poté validována interně. Další informace jsou k dispozici na adrese: https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation

2.2. *Celkové aminokyseliny*

Zvolený postup závisí na zkoumaných aminokyselinách. Cyst(e)in a methionin musí být před hydrolýzou oxidovány na kyselinu cysteovou a na methioninsulfon. Tyrosin se musí stanovovat v hydrolyzátech neoxidovaných vzorků. Všechny ostatní aminokyseliny uvedené v bodě 1 (Účel a oblast použití) mohou být stanovovány buď v oxidovaném, nebo v neoxidovaném vzorku.

Oxidace se provádí při 0 °C směsí kyseliny permravenčí a fenolu. Nadbytečné oxidační činidlo se rozloží disiřičitanem sodným. Oxidovaný nebo neoxidovaný vzorek se hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou (bod 3.20) po 23 hodin. Hydrolyzát se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují ionexovou chromatografií a stanovují se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm (440 nm pro prolin).

3. **Činidla**

Musí být použita dvakrát destilovaná voda nebo voda obdobné jakosti (vodivost < 10 µS).

3.1. Peroxid vodíku, w (w/w) = 30 %.

3.2. Kyselina mravenčí, w (w/w) = 98–100 %.

3.3. Fenol.

3.4. Disiřičitan sodný.

3.5. Hydroxid sodný.

3.6. Kyselina 5-sulfosalicylová, dihydrát.

3.7. Kyselina chlorovodíková o hustotě přibližně 1,18 g/ml.

3.8. Citronan sodný, dihydrát.

3.9. 2,2'-thiodiethanol (thiodiglykol).

3.10. Chlorid sodný.

3.11. Ninhydrin.

3.12. Petrolether, bod varu 40–60 °C.

3.13. Norleucin nebo jiná sloučenina použitelná jako vnitřní standard.

3.14. Dusík, plyn (< 10 ppm kyslíku).

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokyseliny.

3.16.1. Standardní látky aminokyselin uvedených v bodě 1 (Účel a oblast použití). Čisté sloučeniny neobsahující krystalizační vodu. Vysuší se ve vakuu nad P_2O_5 nebo H_2SO_4 1 týden před použitím.

3.16.2. Kyselina cysteová.

3.16.3. Methioninsulfon.

3.17. Roztok hydroxidu sodného, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (bod 3.5) se rozpustí ve vodě a doplní na 1 litr.

3.18. Roztok hydroxidu sodného, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (bod 3.5) se rozpustí ve vodě a doplní na 1 litr.

3.19. Roztok kyseliny mravenčí a fenolu:

smíchá se 889 g kyseliny mravenčí (bod 3.2) se 111 g vody a přidá se 4,73 g fenolu (bod 3.3).

3.20. Hydrolyzační směs, c = 6 mol HCl/l s přídavkem 1 g fenolu/l:

do 492 ml HCl (bod 3.7) se přidá 1 g fenolu (bod 3.3) a doplní se vodou na 1 litr.

3.21. Extrakční směs, c = 0,1 mol HCl/l s přídavkem 2 % thiodiglykolu: 8,2 ml HCl (bod 3.7) se rozředí přibližně 900 ml vody, přidá se 20 ml thiodiglykolu (bod 3.9) a doplní se vodou na 1 litr (nemíchat bod 3.7 a 3.9 přímo).

3.22. Kyselina 5-sulfosalicylová, β = 6 %:

60 g kyseliny 5-sulfosalicylové (bod 3.6) se rozpustí ve vodě a doplní se vodou na 1 litr.

3.23. Oxidační směs (kyselina permravenčí – fenol):

v malé kádince se smíchá 0,5 ml peroxidu vodíku (bod 3.1) s 4,5 ml roztoku kyseliny mravenčí a fenolu (bod 3.19). Ponechá se v klidu jednu hodinu při 20–30 °C, aby se utvořila kyselina permravenčí, před přidáním ke vzorku se směs ochladí v lázni s ledovou vodou (15 minut).

Upozornění: je nutno zamezit kontaktu s kůží a používat ochranný oděv.

3.24. Citrátový tlumivý roztok, c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

v přibližně 800 ml vody se rozpustí 19,61 g citronanu sodného (bod 3.8), 5 ml thiodiglykolu (bod 3.9), 1 g fenolu (bod 3.3) a 16,50 ml HCl (bod 3.7). pH se upraví na 2,20. Doplní se vodou na 1 litr.

3.25. Eluční tlumivé roztoky připravované podle podmínek pro použitý analyzátor (bod 4.9).

3.26. Ninhydrinové činidlo připravované podle podmínek pro použitý analyzátor (bod 4.9).

3.27. Standardní roztoky aminokyselin. Tyto roztoky se uchovávají při teplotě pod 5 °C.

3.27.1. Zásobní standardní roztok aminokyselin (bod 3.16.1),

c = 2,5 µmol/ml pro každou aminokyselinu v kyselině chlorovodíkové.

Tento roztok lze obdržet i komerčně připravený.

3.27.2. Zásobní standardní roztok kyseliny cysteové a methioninsulfonu, c = 1,25 µmol/ml.

Do odměrné baňky o objemu 1 litr se naváží 0,2115 g kyseliny cysteové (bod 3.16.2) a 0,2265 g methioninsulfonu (bod 3.16.3), rozpustí se v citrátovém tlumivém roztoku (bod 3.24) a doplní se jím po značku. Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 12 měsíců. Tento roztok se nepoužívá, pokud zásobní standardní roztok (bod 3.27.1) obsahuje kyselinu cysteovou a methioninsulfon.

3.27.3. Zásobní standardní roztok vnitřního standardu, např. norleucinu, c = 20 µmol/ml.

Do 250 ml odměrné baňky se naváží 0,6560 g norleucinu (bod 3.13), rozpustí se v citrátovém tlumivém roztoku (bod 3.24) a doplní se jím po značku. Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 6 měsíců.

3.27.4. Kalibrační roztok standardních aminokyselin pro použití s hydrolyzáty, c = 5 nmol/50 µl u kyseliny cysteové a methioninsulfonu a c = 10 nmol/50 µl u ostatních aminokyselin. Ve 100 ml kádince se rozpustí 2,2 g chloridu sodného (bod 3.10) v 30 ml citrátového tlumivého roztoku (bod 3.24). Přidají se 4,00 ml zásobního standardního roztoku aminokyselin (bod 3.27.1), 4,00 ml zásobního standardního roztoku kyseliny cysteové a methioninsulfonu (bod 3.27.2) a 0,50 ml zásobního standardního roztoku vnitřního standardu (bod 3.27.3), pokud se používá. pH se upraví na 2,20 hydroxidem sodným (bod 3.18).

Roztok se kvantitativně převede do 50 ml odměrné baňky, doplní se po značku citrátovým tlumivým roztokem (bod 3.24) a zamíchá.

Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 3 měsíce.

Viz také poznámka v bodě 9.1.

3.27.5. Kalibrační roztok standardních aminokyselin pro použití s hydrolyzáty připravenými podle bodu 5.3.3.1 a s extrakty (bod 5.2). Kalibrační roztok se připravuje podle bodu 3.27.4 s vynecháním chloridu sodného.

Skladuje se při teplotě pod 5 °C nejdéle 3 měsíce.

4. **Přístroje**

4.1. Baňka s kulatým dnem o objemu 100 nebo 250 ml opatřená zpětným chladičem.

4.2. Nádoba z borosilikátového skla o objemu 100 ml se šroubovým uzávěrem s gumovým nebo teflonovým těsněním (např. Duran, Schott) pro použití v sušárně.

4.3. Sušárna s nuceným větráním a tepelnou regulací s přesností lepší než ± 2 °C.

4.4. pH metr (tři desetinná místa).

4.5. Membránový filtr (0,22 µm).

4.6. Odstředivka.

4.7. Rotační vakuová odparka.

4.8. Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka.

4.9. Analyzátor aminokyselin nebo zařízení pro HPLC s ionexovou kolonou, zařízením pro postkolonovou derivatizaci ninhydrinem a fotometrickým detektorem.

Kolona se naplní sulfonovanou polystyrenovou pryskyřicí, která je schopna separovat jednotlivé aminokyseliny od sebe navzájem i od ostatních ninhydrin-pozitivních materiálů. Průtok tlumivého roztoku a ninhydrinu zajišťují čerpadla se stálostí průtoku ± 0,5 % po dobu zahrnující standardní kalibraci i analýzu vzorku.

U některých analyzátorů aminokyselin je možné použít postupy hydrolýzy, při nichž hydrolyzát vykazuje koncentraci sodíku c = 0,8 mol/l a obsahuje veškerou zbytkovou kyselinu mravenčí z oxidačního kroku. Jiné analyzátory nezaručují uspokojivou separaci určitých aminokyselin, obsahuje-li hydrolyzát nadbytečnou kyselinu mravenčí a/nebo vysoké koncentrace sodíkových iontů. V takovém případě se sníží objem kyseliny před úpravou pH odpařením hydrolyzátu na objem přibližně 5 ml. Odpaření se provádí ve vakuu při teplotě nejvýše 40 °C.

5. **Postup**

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s oky o velikosti 0,5 mm. Vzorky s vysokou vlhkostí se musí před mletím vysušit buď na vzduchu při teplotě nepřesahující 50 °C, nebo mrazovým sušením. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím extrahují petroletherem (bod 3.12).

5.2. *Stanovení volných aminokyselin*

Do kónické baňky se naváží příslušné množství (1–5 g) připraveného vzorku (bod 5.1) s přesností na 0,2 mg a přidá se 100,0 ml extrakční směsi (bod 3.21). Směs se třepe 60 minut na mechanické třepačce nebo magnetické míchačce (bod 4.8). Po usazení sedimentu se odpipetuje 10,0 ml supernatantu do 100 ml kádinky.

Za stálého míchání se přidá 5,0 ml roztoku kyseliny sulfosalicylové (bod 3.22) a pokračuje se v míchání na magnetické míchačce dalších 5 minut. Supernatant se přefiltruje nebo odstředí tak, aby se odstranila veškerá sraženina. 10,0 ml výsledného roztoku se přenese do 100 ml kádinky, pH se upraví na 2,20 roztokem hydroxidu sodného (bod 3.18), potom se roztok převede pomocí citrátového tlumivého roztoku (bod 3.24) do odměrné baňky přiměřené velikosti a doplní po značku tlumivým roztokem (bod 3.24).

Použije-li se vnitřní standard, přidá se 1,00 ml vnitřního standardu (bod 3.27.3) na každých 100 ml konečného roztoku a potom se doplní po značku tlumivým roztokem (bod 3.24).

Dále se postupuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Nejsou-li extrakty zkoušeny týž den, uchovávají se při teplotě pod 5 °C.

5.3. *Stanovení celkových aminokyselin*

5.3.1. Oxidace

0,1–1 g připraveného vzorku (bod 5.1) se odváží s přesností na 0,2 mg:

— do 100 ml baňky s kulatým dnem (bod 4.1) pro otevřenou hydrolýzu (bod 5.3.2.3) nebo

— do 250 ml baňky s kulatým dnem (bod 4.1), požaduje-li se nízká koncentrace sodíku (bod 5.3.3.1), nebo

— do 100 ml nádoby se šroubovacím uzávěrem (bod 4.2) pro uzavřenou hydrolýzu (bod 5.3.2.4).

Navážka vzorku musí mít obsah dusíku přibližně 10 mg a obsah vlhkosti nepřesahující 100 mg.

Baňka/nádoba se umístí do lázně s ledovou vodou a ochladí se na teplotu 0 °C, potom se přidá 5 ml oxidační směsi (bod 3.23) a promíchá se skleněnou lžící se zahnutou špičkou. Baňka/nádoba se uzavře i se lžící vzduchotěsnou fólií a vloží se v s lázni s ledovou vodou do chladničky a ponechá se v ní 16 hodin při teplotě 0 °C. Po 16 hodinách se vyjme z chladničky a přebytečné oxidační činidlo se rozloží přidáním 0,84 g disiřičitanu sodného (bod 3.4).

Dále se postupuje podle bodu 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolýza

5.3.2.1. Hydrolýza oxidovaných vzorků

K oxidovanému vzorku připravenému podle bodu 5.3.1 se přidá 25 ml hydrolyzační směsi (bod 3.20), přičemž veškeré zbytky vzorku ulpělé na stěnách nádoby a na lžíci se musí opláchnout.

Podle zvoleného postupu hydrolýzy se pokračuje podle bodu 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolýza neoxidovaných vzorků

Do 100 ml nebo 250 ml baňky s kulatým dnem (bod 4.1) nebo do 100 ml nádoby se šroubovacím uzávěrem (bod 4.2) se naváží 0,1–1 g připraveného vzorku (bod 5.1) s přesností na 0,2 mg. Navážka vzorku musí mít obsah dusíku přibližně10 mg. Opatrně se přidá 25 ml hydrolyzační směsi (bod 3.20) a smíchá se vzorkem. Dále se postupuje podle bodu 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4.

5.3.2.3. Otevřená hydrolýza

Ke směsi v baňce (připravené podle bodu 5.3.2.1 nebo 5.3.2.2) se přidají 3 skleněné kuličky a směs se uvede do mírného varu pod zpětným chladičem na dobu 23 hodin. Po skončení hydrolýzy se zpětný chladič promyje 5 ml citrátového tlumivého roztoku (bod 3.24). Baňka se odpojí a ochladí se v ledové lázni.

Dále se postupuje podle bodu 5.3.3.

5.3.2.4. Uzavřená hydrolýza

Nádoba se směsí připravenou podle bodu 5.3.2.1 nebo 5.3.2.2 se umístí do sušárny (bod 4.3) při 110 °C. Aby se během první hodiny zabránilo narůstání tlaku (v důsledku vzniku plynných látek) a aby nedošlo k výbuchu, položí se šroubovací uzávěr volně na nádobu. Nádoba se neuzavírá. Po uplynutí jedné hodiny se uzávěr zašroubuje a uzavřená nádoba se ponechá v sušárně (bod 4.3) 23 hodin. Po skončení hydrolýzy se nádoba vyjme ze sušárny, opatrně se odšroubuje uzávěr a nádoba se postaví do lázně s ledovou vodou. Nechá se vychladnout.

Podle zvoleného postupu pro úpravu pH (bod 5.3.3) se obsah nádoby kvantitativně převede pomocí citrátového tlumivého roztoku (bod 3.24) do 250 ml kádinky nebo do 250 ml baňky s kulatým dnem.

Dále se postupuje podle bodu 5.3.3.

5.3.3. Úprava pH

Podle toho, jakou toleranci k sodíku má analyzátor aminokyselin (bod 4.9), postupuje se při úpravě pH podle bodu 5.3.3.1, nebo 5.3.3.2.

5.3.3.1. Pro chromatografické systémy (bod 4.9) vyžadující nízkou koncentraci sodíku

Pokud použitý analyzátor aminokyselin vyžaduje nízkou koncentraci sodíku (má-li se obsah kyselin snížit), doporučuje se použít zásobní roztok vnitřního standardu (bod 3.27.3).

V takovém případě se před odpařováním přidají do hydrolyzátu 2,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (bod 3.27.3).

Do hydrolyzátu připraveného podle bodu 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4 se přidají 2 kapky 1-oktanolu (bod 3.15).

Na rotační odparce (bod 4.7) se sníží objem na 5–10 ml za vakua při 40 °C. Pokud by se objem nedopatřením snížil pod 5 ml, hydrolyzát je třeba odstranit a analýzu zahájit znovu.

pH se upraví na 2,20 roztokem hydroxidu sodného (bod 3.18) a dále se postupuje podle bodu 5.3.4.

5.3.3.2. Pro všechny ostatní analyzátory aminokyselin (bod 4.9)

Hydrolyzáty připravené podle bodu 5.3.2.3 nebo 5.3.2.4 se částečně zneutralizují opatrným přidáním 17 ml roztoku hydroxidu sodného (bod 3.17) za stálého míchání, přičemž je třeba dbát na to, aby teplota neklesla pod 40 °C.

pH se upraví na 2,20 roztokem hydroxidu sodného (bod 3.17) a nakonec roztokem hydroxidu sodného (bod 3.18) při laboratorní teplotě. Dále se postupuje podle bodu 5.3.4.

5.3.4. Roztok vzorku pro chromatografii

Hydrolyzát (bod 5.3.3.1 nebo 5.3.3.2) s upraveným pH se kvantitativně převede pomocí citrátového tlumivého roztoku (bod 3.24) do 200 ml odměrné baňky a doplní se po značku tlumivým roztokem (bod 3.24).

Nebyl-li dosud použit vnitřní standard, přidají se 2,00 ml vnitřního standardu (bod 3.27.3) a potom se doplní po značku citrátovým tlumivým roztokem (bod 3.24). Důkladně se promíchá.

Dále se pokračuje v chromatografii (bod 5.4).

Nejsou-li roztoky vzorků zkoušeny týž den, uchovávají se při teplotě pod 5 °C.

5.4. *Chromatografie*

Před chromatografií musí mít extrakt (bod 5.2) nebo hydrolyzát (bod 5.3.4) laboratorní teplotu. Směs se protřepe a potřebné množství se přefiltruje 0,22µm membránovým filtrem (bod 4.5). Výsledný čirý roztok se podrobí ionexové chromatografii s použitím analyzátoru aminokyselin (bod 4.9).

Nástřik lze provést ručně nebo automaticky. Přitom je důležité, aby se do kolony přidávalo stejné množství roztoku ± 0,5 % pro analýzu standardů a vzorků s výjimkou případu, kdy je použit vnitřní standard. Rovněž poměr sodíku a aminokyselin by měl být v standardních roztocích a v roztocích vzorků co možná nejpodobnější.

Frekvence kalibrace závisí hlavně na stabilitě ninhydrinového činidla a analytickém systému. Standard nebo vzorek se ředí citrátovým tlumivým roztokem (bod 3.24) tak, aby plocha píku standardu tvořila 30–200 % plochy píku aminokyseliny ve vzorku.

Chromatografie aminokyselin se mírně liší v závislosti na typu použitého analyzátoru a použité pryskyřice. Zvolený systém musí být schopen separovat jednotlivé aminokyseliny od sebe navzájem i od ostatních ninhydrin-pozitivních materiálů. Chromatografický systém musí v rozsahu měření poskytovat lineární odezvu na změny obsahu aminokyselin přidaných do kolony.

Při zkoušení equimolárního roztoku (stanovovaných aminokyselin) by mělo být při chromatografii dosaženo níže uvedených poměrů výšky sedla k vrcholu píku. Tento equimolární roztok musí obsahovat nejméně 30 % maximálního obsahu jednotlivých aminokyselin, což může být přesně měřeno na použitém analyzátoru aminokyselin (bod 4.9).

Při separaci threoninu a serinu nesmí poměr výšky sedla k vrcholu nižšího z píků těchto dvou překrývajících se aminokyselin na chromatogramu přesahovat 2:10 (pokud se stanovuje pouze cyst(e)in, methionin, threonin a lysin, je stanovení nepříznivě ovlivněno nedostatečnou separací od přilehlých píků). Pro všechny ostatní aminokyseliny musí být separace lepší než 1:10.

Systém musí zaručit, že lysin bude separován od „lysinových náhražek“ a ornithinu.

6. **Výpočet výsledků**

Plocha píků vzorku a standardu se měří pro každou jednotlivou aminokyselinu a vypočte se množství (X) aminokyseliny v g na kg vzorku.

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

Je-li použit vnitřní standard, násobí se výsledek: $\frac{D}{C}$

A = plocha píku hydrolyzátu nebo extraktu

B = plocha píku kalibračního standardního roztoku

C = plocha píku vnitřního standardu v hydrolyzátu nebo v extraktu

D = plocha píku vnitřního standardu v kalibračním standardním roztoku

M = molekulární hmotnost stanovované aminokyseliny

c = koncentrace standardu v µmol/ml

m = hmotnost vzorku v g (korigovaná na původní hmotnost, pokud je vzorek vysušen nebo odtučněn)

V = celkový objem hydrolyzátu (bod 5.3.4) v ml nebo celkový objem zředěného extraktu (bod 6.1)

Cystin a cystein se v hydrolyzátech oxidovaného vzorku stanoví jako kyselina cysteová, ale vypočtou se jako cystin ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) s použitím MV 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

Methionin se v hydrolyzátech oxidovaného vzorku stanoví jako methioninsulfon, ale vypočte se jako methionin s použitím M methioninu: 149,21 g/mol.

Přidaný volný methionin se stanoví po extrakci jako methionin, pro výpočet se použije stejná M.

6.1. Celkový objem zředěného extraktu (F) pro stanovení volných aminokyselin (bod 5.2) se vypočte podle tohoto vzorce:

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

V = objem výsledného extraktu.

7. **Evaluace metody**

Tato metoda byla vyzkoušena v mezinárodní srovnávací studii v roce 1990 při použití čtyř různých krmiv (krmná směs pro prasata, krmná směs pro brojlery, proteinový koncentrát, premix).

Poznámka: Tato metoda byla vyzkoušena v druhé mezinárodní srovnávací studii v roce 2003 při použití dvojic slepých duplikátů vzorků výkrmového krmiva pro brojlery, počátečního krmiva pro brojlery, kukuřičné moučky, rybí moučky a drůbeží moučky. Podrobnosti viz EN ISO 13903.

Po vyloučení odlehlých hodnot jsou výsledky mezinárodní srovnávací studie z roku 1990 u středních a standardních odchylek uvedeny v tabulkách v tomto bodě:

Střední hodnoty v g/kg

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Krmná směs pro prasata	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Krmná směs pro brojlery	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinový koncentrát	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premix	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

7.1. *Opakovatelnost*

Opakovatelnost vyjádřená jako „vnitrolaboratorní standardní odchylka“ u srovnání podle předcházející tabulky je uvedena v následujících tabulkách:

Variační koeficient (%) opakovatelnosti (CV_r)

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Krmná směs pro prasata	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Krmná směs pro brojlery	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinový koncentrát	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premix	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

7.2. *Reprodukovatelnost*

Výsledky pro mezilaboratorní standardní odchylku vyplývající z výše uvedeného srovnání jsou uvedeny v následující tabulce:

Variační koeficient (%) reprodukovatelnosti (CV_R)

Referenční materiál	Aminokyselina			
	Threonin	Cyst(e)in	Methionin	Lysin
Krmná směs pro prasata	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Krmná směs pro brojlery	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinový koncentrát	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15

Premix	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = počet zúčastněných laboratoří

8. **Použití referenčních materiálů**

Správné použití uvedené metody se ověří opakovaným měřením certifikovaných referenčních materiálů, jsou-li k dispozici. Doporučuje se kalibrace certifikovanými kalibračními roztoky aminokyselin.

9. **Poznámky**

9.1. Vzhledem k rozdílům mezi analyzátory aminokyselin se za směrodatné považují výsledné koncentrace kalibračních roztoků standardních aminokyselin (viz body 3.27.4 a 3.27.5) a hydrolyzátu (viz bod 5.3.4).

U všech aminokyselin je nutno zkontrolovat rozsah lineární odezvy přístroje.

Standardní roztok se ředí citrátovým tlumivým roztokem tak, aby se dosáhlo ploch píků uprostřed tohoto rozsahu.

9.2. Pokud je k analýze hydrolyzátů použito zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, musí být podmínky zkoušek optimalizovány v souladu s doporučením výrobce.

9.3. Při použití této metody u krmných směsí nebo premixů obsahujících více než 1 % chloridu (koncentráty, minerální krmiva, doplňková krmiva) může dojít k podhodnocení obsahu methioninu, a musí se proto použít speciální postup.

10. **Kritéria účinnosti**

Kompilace výsledků (s výjimkou tyrosinu) pocházejících ze dvou kolaborativních studií (z roku 1990 uvedené v bodě 7 výše a z roku 2005 uvedené v normě EN ISO 13903) udává následující kritéria pro opakovatelnost a reprodukovatelnost. Hodnoty odvozené z těchto dvou mezilaboratorních zkoušek nemusí být použitelné pro jiné než uvedené rozsahy koncentrací a matrice.

10.1 *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v téže laboratoři a týmž laborantem nesmí překročit:

— 6 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě glycinu, alaninu, lysinu, prolinu, kyseliny glutamové, isoleucinu a histidinu,

— 8 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě threoninu, fenylalaninu, methioninu, kyseliny asparagové a leucinu,

— 10 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě argininu a valinu,

— 12 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny serinu,

— 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny cyst(e)inu.

10.2 *Reprodukovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v různých laboratořích a/nebo různými laboranty nesmí překročit:

— 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě glycinu, alaninu a threoninu,

— 20 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě lysinu, prolinu, fenylalaninu, methioninu a kyseliny asparagové,

— 22 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě kyseliny glutamové a leucinu,

— 27 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny argininu,

— 32 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny isoleucinu,

— 35 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě valinu a serinu,

— 40 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny histidinu,

— 50 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny cyst(e)inu.

F. STANOVENÍ OBSAHU TRYPTOFANU

Metody analýzy, které se mají použít pro stanovení obsahu tryptofanu, jsou:

— EN ISO 13904 Krmiva – Stanovení obsahu tryptofanu,

— metoda analýzy popsaná v bodech 1 až 9 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu v krmivech. Nerozlišuje mezi D- a L-formou.

2. **Princip**

Pro stanovení celkového tryptofanu se vzorek hydrolyzuje za alkalických podmínek nasyceným roztokem hydroxidu barnatého při 110 °C po dobu 20 hodin. Po hydrolýze se přidává vnitřní standard.

Pro stanovení volného tryptofanu se vzorek extrahuje za mírně kyselých podmínek v přítomnosti vnitřního standardu.

Tryptofan a vnitřní standard se stanoví v hydrolyzátu nebo extraktu metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Musí být použita dvakrát destilovaná voda nebo voda obdobné jakosti (vodivost < 10 µS/cm).

3.2. Standardní látka: tryptofan (čistota/obsah ≥ 99 %), vakuově vysušený nad oxidem fosforečným.

3.3. Vnitřní standard: α-methyl-tryptofan (čistota/obsah ≥ 99 %), vakuově vysušený nad oxidem fosforečným.

3.4. Hydroxid barnatý, oktahydrát ($Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ nesmí být nadměrně vystavován vzduchu, aby nedocházelo ke vzniku $BaCO_3$, který by mohl narušovat stanovení) (viz poznámka v bodě 9.3).

3.5. Hydroxid sodný.

3.6. Kyselina fosforečná, w (w/w) = 85 %.

3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8. Methanol, pro HPLC.

3.9. Petrolether, bod varu 40–60 °C.

3.10. Roztok hydroxidu sodného, c = 1 mol/l:

40,0 g NaOH (bod 3.5) se rozpustí ve vodě a vodou (bod 3.1) se doplní na 1 litr.

3.11. Kyselina chlorovodíková, c = 6 mol/l:

492 ml HCl (bod 3.7) se doplní vodou na 1 litr.

3.12. Kyselina chlorovodíková, c = 1 mol/l:

82 ml HCl (bod 3.7) se doplní vodou na 1 litr.

3.13. Kyselina chlorovodíková, c = 0,1 mol/l:

8,2 ml HCl (bod 3.7) se doplní vodou na 1 litr.

3.14. Kyselina fosforečná, c = 0,5 mol/l:

34 ml kyseliny fosforečné (bod 3.6) se doplní vodou (bod 3.1) na 1 litr.

3.15. Koncentrovaný roztok tryptofanu (bod 3.2), c = 2,50 µmol/ml:

v 500 ml odměrné baňce se rozpustí 0,2553 g tryptofanu (bod 3.2) v kyselině chlorovodíkové (bod 3.13) a doplní se jí po značku. Skladuje se při −18 °C nejdéle 4 týdny.

3.16. Koncentrovaný roztok vnitřního standardu, c = 2,50 µmol/ml:

v 500 ml odměrné baňce se rozpustí 0,2728 g α-methyl-tryptofanu (bod 3.3) v kyselině chlorovodíkové (bod 3.13) a doplní se jí po značku. Skladuje se při −18 °C nejdéle 4 týdny.

3.17. Kalibrační standardní roztok tryptofanu a vnitřního standardu:

2,00 ml koncentrovaného roztoku tryptofanu (bod 3.15) a 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (α-methyl-tryptofanu) (bod 3.16) se zředí vodou (bod 3.1) a methanolem (bod 3.8) přibližně na stejný objem a přibližně na stejnou koncentraci methanolu (10–30 %) jako v konečném hydrolyzátu.

Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

Během přípravy musí být roztok chráněn před slunečním světlem.

3.18. Kyselina octová.

3.19. 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanol.

3.20. Ethanolamin w (w/w) > 98 %.

3.21. Roztok 1 g 1,1,1-trichlor-2-methyl-2-propanolu (bod 3.19) ve 100 ml methanolu (bod 3.8).

3.22. Mobilní fáze pro HPLC: 3,00 g kyseliny octové (bod 3.18) + 900 ml vody (bod 3.1) + 50,0 ml roztoku (bod 3.21) 1,1,1- trichlor-2-methyl-2-propanolu (bod 3.19) v methanolu (bod 3.8) (1 g/100 ml). pH se upraví na 5,00 ethanolaminem (bod 3.20). Doplní se vodou (bod 3.1) na 1 000 ml.

4. **Přístroje**

4.1. Zařízení pro HPLC se spektrofluorometrickým detektorem.

4.2. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 3 µm, nebo obdobná.

4.3. pH metr.

4.4. Polypropylenová baňka s širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem o objemu 125 ml.

4.5. Membránový filtr, 0,45 µm.

4.6. Autokláv, 110 (± 2) °C, 1,4 (± 0,1) bar.

4.7. Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka.

4.8. Ponorný mixér.

5. **Postup**

5.1. *Příprava vzorků*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s oky o velikosti 0,5 mm. Vzorky s vysokou vlhkostí se musí před mletím vysušit buď na vzduchu při teplotě nepřesahující 50 °C, nebo mrazovým sušením. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím extrahují petroletherem (bod 3.9).

5.2. *Stanovení volného tryptofanu (extrakt)*

Vhodné množství (1–5 g) připraveného vzorku (bod 5.1) se naváží s přesností na 1 mg do kónické baňky. Přidá se 100,0 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.13) a 5,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16). Směs se třepe nebo míchá 60 minut na mechanické třepačce nebo magnetické míchačce (bod 4.7). Sediment se nechá usadit a odpipetuje se 10,0 ml supernatantu do kádinky. Přidá se 5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.14). pH se upraví na 3 roztokem hydroxidu sodného (bod 3.10). Přidá se tolik methanolu (bod 3.8), aby jeho koncentrace v konečném objemu byla 10–30 %. Roztok se převede do odměrné baňky vhodného objemu a zředí se vodou na objem potřebný pro chromatografické stanovení (přibližně stejný objem, jako má kalibrační standardní roztok (bod 3.17)).

Před nástřikem na kolonu HPLC se přefiltruje několik ml roztoku přes 0,45µm membránový filtr (bod 4.5). Dále se postupuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Standardní roztok a extrakty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést analýzu extraktů tentýž den, extrakty lze skladovat při 5 °C nejdéle tři dny.

5.3. *Stanovení celkového tryptofanu (hydrolyzát)*

Do polypropylenové baňky (4.4) se naváží 0,1–1 g připraveného vzorku (bod 5.1) s přesností na 0,2 mg. Navážka vzorku musí mít obsah dusíku přibližně 10 mg. Přidá se 8,4 g oktahydrátu hydroxidu barnatého (bod 3.4) a 10 ml vody. Promíchá se ponorným mixérem (bod 4.8) nebo na magnetické míchačce (bod 4.7). Magnet s teflonovým povrchem se ponechá ve směsi. Stěny nádoby se opláchnou 4 ml vody. Nádoba se uzavře a víčko se volně dotáhne. Uzavřená nádoba se umístí do autoklávu (bod 4.6) s vroucí vodou a nechá se působit pára po dobu 30–60 minut. Potom se autokláv uzavře a směs se autoklávuje 20 hodin při teplotě 110 (± 2) °C.

Před otevřením autoklávu se sníží teplota těsně pod 100 °C. Aby se zabránilo krystalizaci $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, přidá se k horké směsi 30 ml vody o laboratorní teplotě. Mírně se zamíchá nebo protřepe. Přidají se 2,00 ml roztoku koncentrovaného vnitřního standardu (α-methyl-tryptofanu) (bod 3.16). Nádoba se vychladí 15 minut ve vodní lázni s ledem.

Dále se přidá 5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.14). Nádoba se ponechá v ledové lázni a za stálého míchání se neutralizuje roztokem kyseliny chlorovodíkové (bod 3.11) a potom se pH upraví na 3,0 roztokem kyseliny chlorovodíkové (bod 3.12). Přidá se tolik methanolu, aby jeho koncentrace v konečném objemu byla 10–30 %. Roztok se převede do odměrné baňky vhodného objemu a zředí se vodou na stanovený objem, který je nutný pro chromatografické stanovení (např. 100 ml). Přídavek methanolu nesmí způsobit tvorbu sraženiny.

Před nástřikem na kolonu HPLC se přefiltruje několik ml roztoku přes 0,45µm membránový filtr (bod 4.5). Dále se postupuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Standardní roztok a hydrolyzáty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést analýzu hydrolyzátů tentýž den, hydrolyzáty lze skladovat při 5 °C nejdéle tři dny.

5.4. *Stanovení HPLC*

Následující podmínky izokratické eluce jsou doporučené; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky (viz také poznámky v bodě 9.1 a 9.2):

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.2):	125 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 3 µm, nebo obdobná
Teplota kolony:	laboratorní teplota
Mobilní fáze (bod 3.22):	3,00 g kyseliny octové (bod 3.18) + 900 ml vody (bod 3.1) + 50,0 ml roztoku (bod 3.21) 1,1,1-trichlor-2- methyl-2-propanolu (bod 3.19) v methanolu (bod 3.8) (1 g/100 ml). pH se upraví na 5,00 ethanolaminem (bod 3.20). Objem se doplní na 1 000 ml vodou (bod 3.1)
Průtok:	1 ml/min
Celková doba zkoušky:	přibližně 34 minut
Detekční vlnová délka:	excitace: 280 nm, emise: 356 nm.
Objem nástřiku:	20 µl

6. **Výpočet výsledků**

Vypočte se obsah tryptofanu (X) v g na 100 g vzorku.

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

A = plocha píku vnitřního standardu v kalibračním standardním roztoku (bod 3.17)

B = plocha píku tryptofanu v extraktu (bod 5.2) nebo hydrolyzátu (bod 5.3)

V_1 = objem (v ml) (2 ml) koncentrovaného roztoku tryptofanu (bod 3.15) přidaného do kalibračního roztoku (bod 3.17)

c = koncentrace (v µmol/ml) (= 2,50) tryptofanu v koncentrovaném roztoku tryptofanu (bod 3.15) přidaném do kalibračního roztoku (bod 3.17)

V_2 = objem (v ml) (= 2,00 ml) koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16) přidaného při extrakci (bod 5.2) (= 5,00 ml) nebo do hydrolyzátu (bod 5.3)

C = plocha píku vnitřního standardu v extraktu (bod 5.2) nebo hydrolyzátu (bod 5.3)

D = plocha píku tryptofanu v kalibračním standardním roztoku (bod 3.17)

V_3 = objem (v ml) (= 2.00 ml) koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16) přidaného do kalibračního standardního roztoku (bod 3.17)

M = hmotnost vzorku v g (korigovaná na původní hmotnost, pokud byl vzorek vysušen a/nebo odtučněn)

M = molekulární hmotnost tryptofanu (= 204,23 g/mol)

7. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 10 % relat. z hodnoty nejvyššího výsledku.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

Za účelem certifikace metody pro hydrolýzu byla provedena v EU kolaborativní studie (4. srovnání), během níž byly analyzovány tři vzorky v až 12 laboratořích. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Vzorek 1 Krmivo pro prasata	Vzorek 2 Krmivo pro prasata s přidaným L-tryptofanem	Vzorek 3 Krmivový koncentrát pro prasata
L	12	12	12
n	50	55	50
Průměr [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = počet laboratoří, které poskytly výsledky

n = počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem odlehlých hodnot)

s_r = standardní odchylka opakovatelnosti

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

r = opakovatelnost

R = reprodukovatelnost

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti v %

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti v %

Za účelem certifikace metody pro extrakci volného tryptofanu byla provedena v EU další kolaborativní studie (3. srovnání), během níž byly analyzovány dva vzorky v až 13 laboratořích. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Vzorek 4 Směs pšenice a sóji	Vzorek 5 Směs pšenice a sóji (= vzorek 4) s přidaným tryptofanem (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Průměr [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L =	počet laboratoří, které poskytly výsledky
n =	počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem odlehlých hodnot)
s_r =	standardní odchylka opakovatelnosti
S_R =	standardní odchylka reprodukovatelnosti
r =	opakovatelnost
R =	reprodukovatelnost
CV_r =	variační koeficient opakovatelnosti v %
CV_R =	variační koeficient reprodukovatelnosti v %

Za účelem certifikace metody pro hydrolýzu tryptofanu byla provedena v EU další srovnávací studie, během níž byly analyzovány čtyři vzorky v až 7 laboratořích. Výsledky jsou uvedeny níže. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz.

	Vzorek 1 Krmná směs pro prasata (CRM 117)	Vzorek 2 Nízkotučná rybí moučka (CRM 118)	Vzorek 3 Sójová moučka (CRM 119)	Vzorek 4 Sušené odstředěné mléko (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Průměr [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L =	počet laboratoří, které poskytly výsledky
n =	počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem odlehlých hodnot)
s_r =	standardní odchylka opakovatelnosti
S_R =	standardní odchylka reprodukovatelnosti
r =	opakovatelnost
R =	reprodukovatelnost
CV_r =	variační koeficient opakovatelnosti v %
CV_R =	variační koeficient reprodukovatelnosti v %

9. **Poznámky**

9.1. Lepší separace tryptofanu a α-methyl-tryptofanu lze dosáhnout za níže uvedených zvláštních podmínek pro chromatografii.

Po izokratické eluci následuje gradientové čištění kolony:

Kolona pro kapalinovou chromatografii:	125 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 5 µm, nebo obdobná	
Teplota kolony:	32 °C	
Mobilní fáze:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4/methanol, 95 + 5 (V+V).	
	B: methanol	
Gradientový program:	0 min. 100 % A	0 % B
	15 min. 100 % A	0 % B
	17 min. 60 % A	40 % B
	19 min. 60 % A	40 % B
	21 min. 100 % A	0 % B
	33 min. 100 % A	0 % B
Průtok:	1,2 ml/min	
Celková doba zkoušky:	přibližně 33 minut	

9.2. Chromatografie se může měnit podle typu HPLC a náplně kolony. Zvolený systém musí být schopen separovat tryptofan a vnitřní standard až na základní „baseline“. Navíc je důležité, aby byly od tryptofanu a vnitřního standardu dobře separovány degradační produkty. Pro kontrolu základní „baseline“ na úrovni vnitřního standardu pro nečistoty se provede zkouška hydrolyzátu bez přidaného vnitřního standardu. Je důležité, aby doba zkoušky byla dostatečná pro dokonalou eluci všech degradačních produktů, jinak může docházet v následujících chromatografiích k interferencím vlivem píků pozdní eluce.

Chromatografický systém musí v rozsahu měření poskytovat lineární odezvu. Lineární odezva se měří s konstantní (běžnou) koncentrací vnitřního standardu a různými koncentracemi tryptofanu. Je důležité, aby velikost píků tryptofanu i vnitřního standardu byla v lineárním rozsahu HPLC/fluorescenčního systému. Pokud je (jsou) pík(y) tryptofanu a/nebo vnitřního standardu příliš velký (velké) nebo příliš malý (malé), analýza se zopakuje s jinou velikostí vzorku a/nebo s jiným konečným objemem.

9.3. *Hydroxid barnatý*

Stárnutím hydroxidu barnatého se zhoršuje jeho rozpustnost, což způsobuje, že roztok pro stanovení HPLC není čirý a výsledky obsahu tryptofanu mohou být nízké.

G. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÝCH OLEJŮ A TUKŮ

1. **Účel a oblast použití**

Touto metodou se stanoví obsah hrubých olejů a tuků v krmivech.

Podle druhu a složení krmiva a podle účelu, pro který se analýza provádí, se použije jeden ze dvou níže uvedených postupů.

Pro stanovení obsahu hrubých olejů a tuků v olejnatých semenech a plodech, jakož i v krmivech, v nichž je obsah hrubých olejů/tuků vyšší než 15 %, se extrakce provádí postupem A a opětovná extrakce postupem B (bod 5.3).

1.1. Postup A – přímo extrahovatelné hrubé oleje a tuky

Tato metoda je použitelná pro krmiva rostlinného původu s výjimkou těch, která jsou uvedena v postupu B.

1.2. Postup B – celkový obsah hrubých olejů a tuků

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Má se používat pro všechny materiály, z nichž není možné oleje a tuky zcela extrahovat bez předchozí hydrolýzy (např. lepek, kvasnice, bramborové proteiny a produkty, které byly podrobeny zpracování, jako je extruze, vločkování a ohřev).

1.3. *Interpretace výsledků*

Ve všech případech, kdy se dosáhlo postupem B vyššího výsledku než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu výsledek dosažený postupem B.

2. **Princip**

2.1. *Postup A*

Vzorek se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek se vysuší a zváží.

2.2. *Postup B*

Vzorek se hydrolyzuje za horka s kyselinou chlorovodíkovou. Směs se ochladí a přefiltruje. Zbytek na filtru se promyje a vysuší a dále se pokračuje ve stanovení podle postupu A.

3. **Činidla**

3.1. Petrolether, bod varu: 40–60 °C. Bromové číslo musí být menší než 1 a zbytek po odpaření menší než 2 mg/100 ml.

3.2. Síran sodný, bezvodý.

3.3. Kyselina chlorovodíková, c = 3 mol/l.

3.4. Filtrační prostředek, např. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. **Přístroje**

4.1. Extrakční přístroj. Pokud je opatřen sifonem (typ Soxhlet), rychlost refluxu musí být taková, aby docházelo k přibližně 10 přetokům za hodinu; pokud se jedná o typ bezsifonový, rychlost refluxu musí být přibližně 10 ml za minutu.

4.2. Extrakční patrony neobsahující látky rozpustné v petroletheru a s porozitou odpovídající požadavkům uvedeným v bodě 4.1.

4.3. Sušárna, buď vakuová s teplotou 75 ± 3 °C, nebo vzduchová s teplotou 100 ± 3 °C.

5. **Postup**

5.1. Postup A (viz bod 8.1)

Do extrakční patrony (bod 4.2) se naváží 5 g vzorku s přesností na 1 mg a patrona se uzavře tukuprostou vatou.

Patrona se umístí do extrakčního přístroje (bod 4.1) a extrahuje se šest hodin petroletherem (bod 3.1). Petroletherový extrakt se jímá do suché, předem zvážené baňky s úlomky pemzy ([6]).

Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek v baňce se vysuší 1,5 hodiny v sušárně (bod 4.3). Nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Suší se dalších 30 minut, aby se zajistila konstantní hmotnost olejů a tuků (úbytek hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími nesmí být větší než 1 mg).

([6]) Pokud má být vyextrahovaný olej nebo tuk použit pro další zkoušky kvality, nahradí se úlomky pemzy skleněnými kuličkami.

5.2. *Postup B*

Do 400 ml kádinky nebo do 300 ml kónické baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg (viz bod 8.2) a přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.3) a úlomky pemzy. Kádinka se přikryje hodinovým sklem nebo se ke kónické baňce připojí zpětný chladič. Směs se přivede do mírného varu nad malým plamenem nebo na topné desce a udržuje se tak jednu hodinu. Produkt se nesmí usazovat na stěnách nádoby.

Směs se vychladí a přidá se dostatečné množství filtračního prostředku (bod 3.4), aby se zabránilo ztrátám oleje a tuku během filtrace. Filtruje se přes zvlhčený, tukuprostý dvojitý filtrační papír. Zbytek na filtru se promývá studenou vodou, dokud není filtrát neutrální. Provede se kontrola, zda filtrát neobsahuje žádný olej nebo tuk, jinak je nutné před hydrolýzou provést extrakci vzorku petroletherem podle postupu A.

Dvojitý filtrační papír se zbytkem po hydrolýze se umístí na hodinové sklo a suší se 1,5 hodiny ve vzduchové sušárně (bod 4.3) při 100 ± 3 °C.

Dvojitý filtrační papír s vysušeným zbytkem se vloží do extrakční patrony (bod 4.2) a utěsní se tukuprostou vatou. Patrona se umístí do extrakčního přístroje (bod 4.1) a dále se postupuje podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

5.3. *Postup A a opětovná extrakce podle postupu B*

Pro stanovení obsahu hrubých olejů a tuků v olejnatých semenech a plodech, jakož i v krmivech, v nichž je obsah hrubých olejů/tuků vyšší než 15 %, se extrakce provádí postupem A a opětovná extrakce postupem B.

To znamená, že po extrakci petroletherem (postup A) se zbytek nebo část zbytku znovu extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (postup B). Obsah hrubých olejů a tuků je součtem výsledků postupů A a B.

6. Vyjádření výsledku

Hmotnost zbytku se vyjádří jako procento vzorku.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku týmž laborantem nesmí překročit:

— 0,2 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubých olejů a tuků nižšího než 5 %,

— 4,0 % relat. z hodnoty nejvyššího výsledku u obsahu 5–10 %,

— 0,4 % v absolutní hodnotě u obsahu nad 10 %.

8. Poznámky

8.1. U produktů s vysokým obsahem olejů a tuků, které se obtížně melou nebo u kterých je obtížné odebrat homogenní redukovaný zkušební vzorek, se postupuje tímto způsobem:

Naváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg, promíchá se s 10 nebo více gramy bezvodého síranu sodného (bod 3.2). Extrahuje se petroletherem (bod 3.1) podle bodu 5.1. Získaný extrakt se doplní petroletherem (bod 3.1) na objem 500 ml a promíchá. Do malé, suché, předem zvážené baňky s úlomky pemzy se odměří 50 ml tohoto roztoku. Rozpouštědlo se oddestiluje a po vysušení se postupuje podle posledního odstavce bodu 5.1.

Ze zbytku po extrakci v patroně se odstraní veškeré rozpouštědlo a zbytek se umele tak, aby prošel sítem s oky 1 mm. Potom se vrátí do extrakční patrony (síran sodný se již nepřidává) a postupuje se podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

Obsah olejů a tuků se vypočte jako procento vzorku podle tohoto vzorce:

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

kde:

m_1 = hmotnost zbytku po první extrakci v gramech (alikvotní části extraktu),

m_2 = hmotnost zbytku po druhé extrakci v gramech.

8.2. U některých produktů (např. s nízkým obsahem olejů a tuků) se může hmotnost zkušebního vzorku zvýšit.

8.3. Krmivo pro zvířata v zájmovém chovu, které má vysoký obsah vody, je třeba před hydrolýzou a extrakcí podle postupu B smíchat s bezvodým síranem sodným.

8.4. V bodě 5.2 může být účinnější při promývání filtračního zbytku použít horkou vodu místo studené.

8.5. U některých krmiv může být zapotřebí prodloužit dobu sušení nad 1,5 hod. Je však třeba zamezit přílišnému vysušení, které může vést k nižším výsledkům. Lze použít i mikrovlnnou sušárnu.

H. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÉ VLÁKNINY

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovit v krmivu obsah tukuprostých organických látek, které jsou nerozpustné v roztoku kyseliny a zásady a jsou běžně nazývány hrubá vláknina.

Tato metoda není použitelná v případě lignocelulózy a rostlinného uhlí (příliš jemné částice).

2. Princip

Vzorek se v případě potřeby odtuční a působí se na něj postupně vroucím roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného o přesně stanovené koncentraci. Zbytek se oddělí filtrací přes skleněný filtrační kelímek, promyje, vysuší, zváží a spálí při teplotě 475–500 °C. Úbytek váhy po spálení odpovídá obsahu hrubé vlákniny ve zkušebním vzorku.

3. Činidla

3.1. Kyselina sírová, c = 0,13 mol/l.

3.2. Odpěňovací činidlo (např. n-oktanol).

3.3. Filtrační pomůcka (Celit 545 nebo obdobná) žíhaná při 500 °C po čtyři hodiny (bod 8.6).

3.4. Aceton.

3.5. Petrolether, bod varu 40–60 °C.

3.6. Kyselina chlorovodíková, c = 0,5 mol/l.

3.7. Roztok hydroxidu draselného, c = 0,23 mol/l.

4. Přístroje

4.1. Zahřívací jednotka pro mineralizaci roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného, s oporou pro filtrační kelímek (bod 4.2) a vybavená vypouštěcí trubicí s ventilem na vypouštěné kapaliny a vakuum, popřípadě stlačený vzduch. Každý den se zařízení před použitím pět minut předehřívá vroucí vodou.

4.2. Skleněný filtrační kelímek s porézní vložkou (fritou) ze slinutého skla o velikosti pórů 40–90 µm. Před prvním použitím se kelímek několik minut zahřeje na 500 °C a potom vychladí (bod 8.6).

4.3. Hydrolyzační nádobka o objemu nejméně 270 ml se zpětným chladičem, vhodná pro vaření.

4.4. Sušárna s regulací teploty.

4.5. Muflová pec s regulací teploty.

4.6. Extrakční jednotka s oporou pro filtrační kelímek (bod 4.2) vybavená vypouštěcí trubicí s ventilem na vypouštěné kapaliny a vakuum.

4.7. Spojovací kroužky pro spojení zahřívací jednotky (bod 4.1), filtračního kelímku (bod 4.2) a hydrolyzační nádobky (bod 4.3) a pro připojení kelímku ke studené extrakční jednotce (bod 4.6).

5. **Postup**

Do filtračního kelímku (bod 4.2) se naváží 1 g připraveného vzorku s přesností na 1 mg (viz poznámky v bodech 9.1, 9.2 a 9.3) a přidá se 1 g filtrační pomůcky (bod 3.3).

Filtrační kelímek (bod 4.2) se připojí k zahřívací jednotce (bod 4.1) a poté k hydrolyzační nádobce (bod 4.3). Do spojené hydrolyzační nádobky a filtračního kelímku se nalije 150 ml vroucího roztoku kyseliny sírové (bod 3.1) a v případě potřeby se přidá několik kapek odpěňovacího činidla (bod 3.2).

Kapalina se přivede během 5 ± 2 minut do varu a intenzivně se vaří přesně 30 minut.

Otevře se vypouštěcí ventil (bod 4.1) a kyselina sírová se odsaje za použití vakua přes filtrační kelímek a zbytek se promyje třikrát 30 ml vroucí vody, vždy do úplného odsátí po každém promytí.

Vypouštěcí ventil se uzavře, přidá se 150 ml vroucího roztoku hydroxidu draselného (bod 3.7) do spojené hydrolyzační nádobky a filtračního kelímku a přidá se několik kapek odpěňovacího činidla (bod 3.2). Kapalina se přivede během 5 ± 2 minut do varu a intenzivně se vaří přesně 30 minut. Přefiltruje se a zopakuje se promývání jako u kyseliny sírové.

Po skončení promývání a odsávání se filtrační kelímek se svým obsahem odpojí a připojí se ke studené extrakční jednotce (bod 4.6). Za použití vakua se zbytek promyje ve filtračním kelímku třikrát 25 ml acetonu (bod 3.4), vždy do úplného odsátí po každém promytí.

Filtrační kelímek se vysuší do konstantní hmotnosti v sušárně při teplotě 130 °C. Po každém vysušení a ochlazení v exsikátoru se vždy rychle zváží. Filtrační kelímek se vloží do muflové pece a spaluje při 475–500 °C nejméně 30 minut do konstantní hmotnosti (úbytek hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími nesmí být větší než 2 mg).

Po každém spalování a ochlazení nejprve v peci a potom v exsikátoru se zváží.

Provede se slepá zkouška bez zkoušeného vzorku. Úbytek hmotnosti po spalování nesmí být větší než 4 mg.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah hrubé vlákniny jako procento vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

m = hmotnost vzorku v g,

m_0 = úbytek hmotnosti po spálení při vlastním stanovení v g,

m_1 = úbytek hmotnosti po spálení při slepé zkoušce v g.

7. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit:

— 0,6 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubé vlákniny nižšího než 10 %,

— 6 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu hrubé vlákniny 10 % a více.

8. **Reprodukovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u téhož vzorku v různých laboratořích nesmí překročit:

— 1,0 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubé vlákniny nižšího než 10 %,

— 10 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu hrubé vlákniny 10 % a více.

9. **Poznámky**

9.1. Krmiva, která obsahují více než 10 % hrubého tuku, musí být před analýzou odtučněna petroletherem (bod 3.5). Filtrační kelímek (bod 4.2) s obsahem se připojí ke studené extrakční jednotce (bod 4.6) a zbytek se za použití vakua promyje třikrát 30 ml petroletheru, vždy do úplného odsátí. Potom se kelímek se svým obsahem připojí k zahřívací jednotce (bod 4.1) a pokračuje se podle bodu 5.

9.2. Krmiva obsahující tuk, který nelze přímo extrahovat petroletherem (bod 3.5), musí být odtučněna podle bodu 8.1 a potom ještě jednou po varu s kyselinou. Po varu s kyselinou a následném promytí se filtrační kelímek se svým obsahem připojí ke studené extrakční jednotce (bod 4.6) a promyje se třikrát 30 ml acetonu a následně třikrát 30 ml petroletheru. Odsaje se do sucha za použití vakua a pokračuje se ve zkoušce podle bodu 5 od přidání hydroxidu draselného.

9.3. Pokud krmivo obsahuje více než 5 % uhličitanů vyjádřených jako uhličitan vápenatý, připojí se filtrační kelímek (bod 4.2) s naváženým vzorkem k zahřívací jednotce (bod 4.1). Vzorek se promyje třikrát 30 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.6). Po každém přidání kyseliny se filtruje po minutové prodlevě. Nakonec se promyje 30 ml vody a pokračuje se podle bodu 5.

9.4. Pokud se používá přístroj ve formě stojanu (několik filtračních kelímků je připojeno k jedné zahřívací jednotce), nesmí se provádět dvě paralelní stanovení u téhož vzorku ve stejné sérii.

9.5. Pokud je po varu obtížné kyselé a zásadité roztoky přefiltrovat, použije se stlačený vzduch z odvodní trubice zahřívací jednotky a potom se pokračuje ve filtraci.

9.6. Teplota spalování nesmí přesáhnout 500 °C, aby se prodloužila životnost skleněných filtračních kelímků. Během zahřívání a ochlazování nesmí být kelímky vystaveny nadměrnému teplotnímu šoku.

I. STANOVENÍ OBSAHU CUKRŮ

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu redukujících cukrů a celkového obsahu cukrů po inverzi vyjádřených jako glukóza nebo v příslušném případě sacharóza s použitím faktoru 0,95. Je použitelná pro krmné směsi. Pro ostatní krmiva jsou používány zvláštní metody. Je-li to nutné, může být obsah laktózy měřen zvlášť a potom zahrnut do celkového výsledku.

Tato metoda se použije pro stanovení obsahu cukrů pro výpočet energetické hodnoty krmiva.

Má-li být obsah cukrů stanoven pro jiné účely, lze použít jiné metody analýzy.

2. **Princip**

Cukry se vyextrahují zředěným ethanolem. Roztok se vyčeří Carrezovými činidly I a II. Ethanol se odstraní a množství cukrů před inverzí a po inverzi se stanoví Luff-Schoorlovou metodou.

3. **Činidla**

3.1. Roztok ethanolu 40 % (v/v), hustota: 0,948 g/ml při 20 °C, neutralizovaný na fenolftalein.

3.2. Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.

3.3. Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g hexakyanidoželeznatanu draselného $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Doplní se vodou na 100 ml.

3.4. Roztok methyloranže 0,1 % (w/v).

3.5. Kyselina chlorovodíková 4 mol/l.

3.6. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l.

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

3.8. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání se nalije roztok kyseliny citronové (bod 3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (bod 3.8.3). Přidá se roztok síranu měďnatého (bod 3.8.1) a doplní se vodou na 1 litr. Nechá se přes noc usadit a pak se přefiltruje.

Zkontroluje se koncentrace takto získaného činidla (Cu – 0,05 mol/l; Na_2CO_3 – 1 mol/l), viz poslední odstavec bodu 5.4. pH tohoto roztoku musí být přibližně 9,4.

3.8.1. Roztok síranu měďnatého: ve 100 ml vody se rozpustí 25 g síranu měďnatého ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) prostého železa.

3.8.2. Roztok kyseliny citronové: v 50 ml vody se rozpustí 50 g kyseliny citronové ($C_6H_8O_7 \bullet H_2O$).

3.8.3. Roztok uhličitanu sodného: v přibližně 300 ml teplé vody se rozpustí 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného. Nechá se vychladnout.

3.9. Roztok thiosíranu sodného 0,1 mol/l.

3.10. Roztok škrobu: ve 30 ml vody se rozpustí 5 g škrobu a tato směs se přidá do 1 litru vroucí vody. Vaří se tři minuty, nechá se vychladnout a v případě potřeby se přidá 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

3.11. Kyselina sírová 3 mol/l.

3.12. Roztok jodidu draselného 30 % (w/v).

3.13. Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená.

3.14. 3-Methylbutan-l-ol.

4. **Přístroje**

Míchací zařízení: přibližně 35 až 40 ot/min.

5. **Postup**

5.1. *Extrakce vzorku*

Do 250 ml odměrné baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 200 ml ethanolu (bod 3.1) a míchá se po dobu jedné hodiny na míchacím zařízení. Přidá se 5 ml Carrezova činidla I (bod 3.2) a míchá se přibližně 30 sekund. Přidá se 5 ml Carrezova činidla II (bod 3.3) a znovu se míchá jednu minutu. Doplní se po značku ethanolem (bod 3.1), homogenizuje a přefiltruje. Odpipetuje se 200 ml filtrátu a odpaří se na přibližně polovinu objemu, aby se odstranila většina ethanolu. Zbytek po odpařování se kvantitativně převede do 200 ml odměrné baňky pomocí teplé vody, zchladí se, doplní se vodou po značku, homogenizuje a v případě potřeby přefiltruje. Tento roztok se použije pro stanovení obsahu redukujících cukrů a po inverzi pro stanovení celkového obsahu cukrů.

5.2. *Stanovení redukujících cukrů*

Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje méně než 60 mg redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní destilovanou vodou na 25 ml. Obsah redukujících cukrů se stanoví Luff-Schoorlovou metodou. Výsledek se vyjádří jako procentní obsah glukózy ve vzorku.

5.3. *Stanovení celkového obsahu cukrů po inverzi*

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku. Přidá se několik kapek roztoku methyloranže (bod 3.4) a potom se za stálého, opatrného míchání přidá kyselina chlorovodíková (bod 3.5), až se kapalina trvale zbarví do červena. Poté se přidá 15 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.6) a baňka se ponoří do silně vroucí vodní lázně, kde se ponechá 30 minut. Rychle se vychladí na přibližně 20 °C a přidá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (bod 3.7). Doplní se vodou do 100 ml a homogenizuje. Odpipetuje se maximálně 25 ml roztoku, který obsahuje méně než 60 mg redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza. V případě potřeby se odpipetovaný objem doplní destilovanou vodou na 25 ml a obsah redukujících cukrů se stanoví Luff-Schoorlovou metodou. Výsledek se vyjádří jako procento glukózy nebo, v příslušném případě, sacharózy po vynásobení faktorem 0,95.

5.4. *Titrace Luff-Schoorlovou metodou*

Do 300 ml Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 25 ml Luff-Schoorlova činidla (bod 3.8); přidá se přesně 25 ml vyčeřeného cukerného roztoku. Přidají se dvě granule pemzy (bod 3.13) a při ručním míchání se zahřívá nad otevřeným plamenem střední délky tak, aby se kapalina přivedla přibližně během dvou minut do varu. Pak se Erlenmeyerova baňka neprodleně umístí na azbestem potaženou drátěnou síťku s otvorem o průměru přibližně 6 cm, pod kterou byl zapálen plamen. Tento plamen musí být regulován tak, aby se zahřívalo pouze dno Erlenmeyerovy baňky. K Erlenmeyerově baňce se připojí zpětný chladič vaří se přesně deset minut. Potom se baňka ihned ochladí ve studené vodě a přibližně po pěti minutách se titruje takto:

Do baňky se přidá 10 ml roztoku jodidu draselného (bod 3.12) a ihned poté (opatrně, vzhledem k riziku nadměrného pěnění) se přidá 25 ml kyseliny sírové (bod 3.11). Titruje se roztokem thiosíranu sodného (bod 3.9), až se objeví kalně žlutá barva. Pak se přidá škrobový indikátor (bod 3.10) a titrace se dokončí.

Stejná titrace se provede s přesně odměřenou směsí 25 ml Luff-Schoorlova činidla (bod 3.8) a 25 ml vody, po přidání 10 ml roztoku jodidu draselného (bod 3.12) a 25 ml kyseliny sírové (bod 3.11) bez vaření.

6. **Výpočet výsledků**

S použitím tabulky se stanoví obsah glukózy v mg, který odpovídá rozdílu mezi hodnotami obou titrací vyjádřených v ml thiosíranu sodného 0,1 mol/l. Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Zvláštní postupy**

7.1. V případě krmiv bohatých na melasu a jiných krmiv, která nejsou zcela homogenní, se do 1 000 ml odměrné baňky naváží 20 g vzorku a přidá se 500 ml vody. Míchá se jednu hodinu na míchacím zařízení. Vyčeří se Carrezovými činidly I (bod 3.2) a II (bod 3.3), jak je uvedeno v bodě 5.1, ale v tomto případě se čtyřnásobným množstvím obou činidel. Doplní se po značku 80 % ethanolem (v/v).

Homogenizuje se a přefiltruje. Ethanol se odstraní postupem uvedeným v bodě 5.1. Pokud ve směsi není žádný dextrinovaný škrob, doplní se po značku destilovanou vodou.

7.2. V případě melas a krmných surovin, které jsou bohaté na cukry a téměř bez škrobu (svatojánský chléb, sušené řepné řízky atd.), se odváží 5 g, vloží se do 250 ml odměrné baňky, přidá se 200 ml destilované vody a míchá se na míchacím zařízení po dobu jedné hodiny a v případě potřeby i déle. Vyčeří se Carrezovými činidly I (bod 3.2) a II (bod 3.3), jak uvedeno v bodě 5.1. Doplní se po značku studenou vodou, homogenizuje a přefiltruje. Pro stanovení celkového obsahu cukrů se dále postupuje podle bodu 5.3.

8. **Poznámky**

8.1. Pro zamezení pěnění se doporučuje přidat (bez ohledu na objem vzorku) přibližně 1 ml 3-methylbutan-1-olu (bod 3.14) před varem s Luff-Schoorlovým činidlem.

8.2. Rozdíl mezi celkovým obsahem cukrů po inverzi vyjádřených jako glukóza a obsahem redukujících cukrů vyjádřených jako glukóza vynásobený koeficientem 0,95 udává procentní obsah sacharózy.

8.3. Pro stanovení obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, mohou být použity dvě metody:

8.3.1. Pro přibližný výpočet se obsah laktózy stanovený jinou metodou analýzy vynásobí koeficientem 0,675 a výsledek se odečte od obsahu redukujících cukrů.

8.3.2. Pro přesný výpočet obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, se tentýž vzorek musí použít pro dvě konečná stanovení. Jedna analýza se provede s částí roztoku získaného podle bodu 5.1, druhá analýza se provede s částí roztoku získaného při stanovení laktózy metodou určenou pro tento účel (po fermentaci ostatních druhů cukrů a vyčeření).

V obou případech se obsah přítomného cukru stanoví Luff-Schoorlovou metodou a vyjádří v mg glukózy. Jedna hodnota se odečte od druhé a rozdíl se vyjádří jako procento vzorku.

Příklad

Oba objemy odpovídají pro každé stanovení vzorku o hmotnosti 250 mg.

V prvním případě je spotřebováno 17 ml roztoku thiosíranu sodného s koncentrací 0,1 mol/l, což odpovídá 44,2 mg glukózy. V druhém případě je spotřebováno 11 ml téhož roztoku, což odpovídá 27,6 mg glukózy.

Rozdíl činí 16,6 mg glukózy.

Obsah redukujících cukrů (s výjimkou laktózy) vyjádřených jako glukóza je tedy:

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

Tabulka hodnot pro 25 ml Luff-Schoorlova činidla

ml roztoku thiosíranu sodného ($Na_2S_2O_3$) 0,1 mol/l, dvě minuty zahřívání k varu a deset minut varu

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Glukóza, fruktóza, invertní cukry $C_6H_{12}O_6$		Laktóza $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	rozdíl	mg	rozdíl	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. STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu laktózy v krmivech obsahujících více než 0,5 % laktózy.

2. **Princip**

Cukry se rozpustí ve vodě. Roztok se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechají laktózu v nezměněném stavu. Po vyčeření a filtraci se obsah laktózy ve filtrátu stanoví Luff-Schoorlovou metodou.

3. **Činidla**

3.1. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* – suspenze: ve 100 ml vody se suspenduje 25 g čerstvého droždí. Suspenze vydrží v chladničce maximálně jeden týden.

3.2. Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.

3.3. Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g hexakyanidoželeznatanu draselného $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Doplní se vodou na 100 ml.

3.4. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání se nalije roztok kyseliny citronové (bod 3.4.2) do roztoku uhličitanu sodného (bod 3.4.3). Přidá se roztok síranu měďnatého (bod 3.4.1) a doplní se vodou na 1 litr. Nechá se přes noc usadit a pak se přefiltruje. Zkontroluje se koncentrace takto získaného činidla (Cu – 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). pH tohoto roztoku musí být přibližně 9,4.

3.4.1. Roztok síranu měďnatého: ve 100 ml vody se rozpustí 25 g síranu měďnatého ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) prostého železa.

3.4.2. Roztok kyseliny citronové: v 50 ml vody se rozpustí 50 g kyseliny citronové ($C_6H_8O_7 \bullet H_2O$).

3.4.3. Roztok uhličitanu sodného: v přibližně 300 ml teplé vody se rozpustí 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného. Nechá se vychladnout.

3.5. Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená.

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

3.7. Kyselina sírová 3 mol/l.

3.8. Roztok thiosíranu sodného 0,1 mol/l.

3.9. Roztok škrobu: ve 30 ml vody se rozpustí 5 g škrobu a tato směs se přidá do jednoho litru vroucí vody. Vaří se tři minuty, nechá se vychladnout a v případě potřeby se přidá 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

4. **Přístroje**

Vodní lázeň s termostatem nastaveným na 38–40 °C.

5. **Postup**

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 25–30 ml vody. Baňka se umístí do vroucí vodní lázně na 30 minut a potom se ochladí na teplotu přibližně 35 °C. Přidá se 5 ml suspenze kvasinek (bod 3.1) a homogenizuje. Obsah baňky se nechá stát po dobu dvou hodin ve vodní lázni o teplotě 38–40 °C a potom se ochladí na teplotu přibližně 20 °C.

Přidá se 2,5 ml Carrezova činidla I (bod 3.2) a 30 sekund se míchá. Potom se přidá 2,5 ml Carrezova činidla II (bod 3.3) a znovu se míchá 30 sekund. Doplní se vodou na 100 ml, zamíchá se a přefiltruje. Do 300 ml Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje část filtrátu, nejvýše 25 ml, která obsahuje pokud možno 40–80 mg laktózy. Pokud je třeba, doplní se vodou na 25 ml.

Stejným způsobem se provede slepá zkouška s 5 ml suspenze kvasinek (bod 3.1). Stanoví se obsah laktózy Luff-Schoorlovou metodou tímto způsobem: přidá se přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (bod 3.4) a dvě granule pemzy (bod 3.5). Při ručním míchání se zahřívá nad otevřeným plamenem střední délky tak, aby se kapalina přivedla přibližně během dvou minut do varu. Pak se Erlenmeyerova baňka neprodleně umístí na azbestem potaženou drátěnou síťku s otvorem o průměru přibližně 6 cm, pod kterou byl zapálen plamen.

Tento plamen musí být regulován tak, aby se zahřívalo pouze dno Erlenmeyerovy baňky. K Erlenmeyerově baňce se připojí zpětný chladič. Vaří se přesně deset minut. Potom se baňka ihned ochladí ve studené vodě a přibližně po pěti minutách se titruje takto:

Přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (bod 3.6) a ihned poté (opatrně, vzhledem k riziku nadměrného pěnění) se přidá 25 ml kyseliny sírové (bod 3.7). Titruje se roztokem thiosíranu sodného (bod 3.8), až se objeví kalně žlutá barva. Pak se přidá škrobový indikátor (bod 3.9) a titrace se dokončí.

Stejná titrace se provede s přesně odměřenou směsí 25 ml Luff-Schoorlova činidla (bod 3.4) a 25 ml vody, po přidání 10 ml roztoku jodidu draselného (bod 3.6) a 25 ml kyseliny sírové (bod 3.7) bez vaření.

6. **Výpočet výsledků**

S použitím tabulky uvedené níže se stanoví obsah laktózy v mg, který odpovídá rozdílu mezi výsledky dvou titrací, vyjádřených v ml roztoku thiosíranu sodného 0,1 mol/l.

Výsledek se vyjádří jako bezvodá laktóza vyjádřená jako procento vzorku.

7. **Poznámka**

1. U produktů obsahujících více než 40 % zkvasitelného cukru se použije více než 5 ml suspenze kvasinek (bod 3.1).

2. V krmivu „se sníženým obsahem laktózy“ (např. mléko pro kočky) se laktóza přeměňuje na fruktózu, která není do dvou hodin zcela fermentována, což vede k vyšším nebo falešně pozitivním výsledkům (jelikož rezidua fruktózy zůstávají v extraktu).

Tabulka hodnot pro 25 ml Luff-Schoorlova činidla

ml roztoku thiosíranu sodného ($Na_2S_2O_3$) 0,1 mol/l, dvě minuty zahřívání k varu a deset minut varu

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Glukóza, fruktóza, invertní cukry $C_6H_{12}O_6$		Laktóza $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	rozdíl	mg	rozdíl	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

K. STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU

– POLARIMETRICKÁ METODA –

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu škrobu a degradačních produktů škrobu s vysokou molekulární hmotností v krmivech za účelem kontroly shody s deklarovanou energetickou hodnotou (ustanovení v příloze VII) a s nařízením (ES) č. 767/2009.

Tato metoda se použije pro stanovení obsahu škrobu pro výpočet energetické hodnoty krmiva.

Má-li být obsah škrobu stanoven pro jiné účely, lze použít jiné metody analýzy.

2. **Princip**

Metoda zahrnuje dvě stanovení. V prvním stanovení je vzorek podroben působení zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po vyčeření a filtraci je polarimetricky měřena optická otáčivost roztoku.

V druhém stanovení je vzorek extrahován 40 % ethanolem. Po okyselení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčeření a filtraci je optická otáčivost roztoku měřena stejně jako u prvního stanovení.

Rozdíl mezi těmito dvěma měřeními násobený známým faktorem udává obsah škrobu ve vzorku.

3. **Činidla**

3.1. Kyselina chlorovodíková, roztok 25 % (w/w), hustota: 1,126 g/ml.

3.2. Kyselina chlorovodíková, roztok 1,13 % (w/v).

Koncentrace se musí zkontrolovat titrací za použití roztoku hydroxidu sodného 0,1 mol/l a přítomnosti 0,1 % (w/v) methylčerveně v 94 % (v/v) ethanolu. Pro neutralizaci 10 ml je zapotřebí 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.

3.4. Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g hexakyanidoželeznatanu draselného $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Doplní se vodou na 100 ml.

3.5. Ethanol, roztok 40 % (v/v), hustota: 0,948 g/ml při 20 °C.

4. **Přístroje**

4.1. 250 ml Erlenmeyerova baňka se standardním skleněným zábrusem a zpětným chladičem.

4.2. Polarimetr nebo sacharimetr.

5. **Postup**

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s kulatými oky o velikosti 0,5 mm.

5.2. Stanovení celkové optické otáčivosti (P nebo S) (viz poznámka 7.1)

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 2,5 g umletého vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 25 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.2), protřepe se, aby se zkušební vzorek rovnoměrně rozprostřel, a potom se přidá dalších 25 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.2). Baňka se ponoří do vroucí vodní lázně a první tři minuty se s ní intenzivně třepe, aby nedošlo k tvorbě shluků. Množství vody ve vodní lázni musí být takové, aby při ponoření baňky do lázně nedošlo k přerušení varu. Během protřepávání nesmí být baňka vyjmuta z lázně. Přesně po 15 minutách se baňka vyjme z lázně, přidá se 30 ml studené vody a ihned se ochladí na 20 °C.

Přidá se 5 ml Carrezova činidla I (bod 3.3) a přibližně 30 sekund se protřepává. Přidá se 5 ml Carrezova činidla II (bod 3.4) a opět se protřepává přibližně 30 sekund. Baňka se doplní po značku vodou, promíchá a přefiltruje. Pokud není filtrát zcela čirý (k tomu dochází pouze výjimečně), stanovení se zopakuje s použitím většího množství Carrezových činidel I a II, například 10 ml.

Optická otáčivost roztoku se měří na polarimetru nebo sacharimetru v 200 mm trubici.

5.3. *Stanovení optické otáčivosti (P' nebo S') látek rozpustných ve 40 % ethanolu*

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 5 g vzorku s přesností na 1 mg a přidá se asi 80 ml ethanolu (bod 3.5) (viz poznámka v bodě 7.2). Baňka se nechá stát 1 hodinu při laboratorní teplotě; během této doby se šestkrát důkladně protřepe, aby se zkušební vzorek zcela promísil s ethanolem. Doplní se ethanolem (bod 3.5) po značku, promíchá a přefiltruje.

Odpipetuje se 50 ml filtrátu (= 2,5 g vzorku) do 250 ml Erlenmeyerovy baňky, přidá se 2,1 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1) a důkladně se protřepe. K Erlenmeyerově baňce se připojí zpětný chladič a baňka se ponoří do vroucí vodní lázně. Přesně po 15 minutách se Erlenmeyerova baňka vyjme z lázně, její obsah se převede do 100 ml odměrné baňky, varná baňka se vypláchne malým množstvím studené vody a ochladí se na 20 °C.

Potom se vyčeří Carrezovými činidly I a II (bod 3.3 a 3.4), doplní se vodou po značku, promíchá a přefiltruje. Při měření optické otáčivosti se postupuje podle druhého a třetího odstavce bodu 5.2.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah škrobu (v %) se vypočte podle těchto vzorců:

6.1. *Měření na polarimetru*

$$\text{Obsah škrobu (v \%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

P = celková optická otáčivost v úhlových stupních

P' = optická otáčivost v úhlových stupních látek rozpustných ve 40 % (v/v) ethanolu

$[\alpha]_D^{20°}$ = specifická optická otáčivost čistého škrobu. Konvenční číselné hodnoty přijaté pro tento faktor jsou následující:

+ 185,9°: rýžový škrob

+ 185,7°: bramborový škrob

+ 184,6°: kukuřičný škrob

+ 182,7°: pšeničný škrob

+ 181,5°: ječný škrob

+ 181,3°: ovesný škrob

+ 184,0°: ostatní typy škrobu a škrobových směsí v krmných směsích

6.2. *Měření na sacharimetru*

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

S = celková optická otáčivost ve stupních sacharizace

S' = optická otáčivost ve stupních sacharizace látek rozpustných ve 40 % (v/v) ethanolu

N = hmotnost sacharózy v g ve 100 ml vody, která poskytne ve 200 mm trubici optickou otáčivost rovnou 100° sacharizace

16,29 g pro francouzské sacharimetry

26,00 g pro německé sacharimetry

20,00 g pro směsné sacharimetry

$[\alpha]_D^{20°}$ = specifická optická otáčivost čistého škrobu (viz bod 6.1).

6.3. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 0,4 v absolutní hodnotě u obsahu škrobu nižšího než 40 % a 1 % relat. u obsahu škrobu 40 % a více.

7. **Poznámky**

7.1. Pokud vzorek obsahuje více než 6 % uhličitanů vyjádřených jako uhličitan vápenatý, musí být přítomné uhličitany před stanovením celkové optické otáčivosti rozloženy přesně odpovídajícím množstvím zředěné kyseliny sírové.

7.2. U produktů s vysokým obsahem laktózy, jako např. sušené mléčné sérum nebo sušené odstředěné mléko, se po přidání 80 ml ethanolu (bod 3.5) postupuje níže uvedeným způsobem. K baňce se připojí zpětný chladič a baňka se ponoří do vodní lázně o teplotě 50 °C na 30 minut. Nechá se vychladnout a dále se pokračuje podle bodu 5.3.

7.3. Pokud jsou v krmivu ve významném množství přítomny níže uvedené krmné suroviny, dochází k při stanovení škrobu polarimetrickou metodou interferencím, což může způsobit nesprávné výsledky:

— produkty z (cukrové) řepy jako (cukrová) řepná pulpa, (cukrová) řepná melasa, směs (cukrové) řepné pulpy a melasy, (cukrová) řepná vináza, (řepný) cukr,

— citrusová pulpa,

— lněné semeno, lněné expelery, extrahované lněné semeno,

— řepkové semeno, řepkové expelery, extrahované řepkové semeno, řepkové slupky,

— slunečnicové semeno, extrahované slunečnicové semeno, slunečnicové semeno částečně loupané, extrahované,

— expelery z kopry, extrahovaná kopra,

— bramborová pulpa,

— sušené kvasnice,

— produkty bohaté na inulin (např. chipsy a moučka z topinamburů),

— škvarky,

— produkty ze sójových bobů.

V těchto případech lze použít metodu analýzy stanovenou v nařízení Komise (ES) č. 121/2008 ([7]). Tuto metodu lze použít i pro krmiva obsahující méně než 1 % škrobu.

([7]) Nařízení Komise (ES) č. 121/2008 ze dne 11. února 2008, kterým se stanoví metoda analýzy pro stanovení obsahu škrobu v přípravcích používaných k výživě zvířat (kód KN 2309) (Úř. věst. L 37, 12.2.2008, s. 3).

L. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÉHO POPELA

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu hrubého popela v krmivech.

2. **Princip**

Vzorek se zpopelní při 550 °C; zbytek se zváží.

3. **Činidla**

Dusičnan amonný, roztok 20 % (w/v).

4. **Přístroje**

4.1. Topná deska.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatem.

4.3. Spalovací kelímky z křemene, porcelánu nebo platiny, buď pravoúhlé (asi 60 × 40 × 25 mm), nebo kulaté (průměr 60 až 75 mm, výška 20 až 40 mm).

5. **Postup**

Do spalovacího kelímku, který byl předem zahřát na teplotu 550 °C, ochlazen a zvážen, se s přesností na 1 mg naváží přibližně 5 g vzorku (2,5 g v případě produktů, které mají během spalování tendenci zvětšovat svůj objem). Potom se kelímek položí na topnou desku a postupně se zahřívá, až látka zuhelnatí. Spaluje se podle bodu 5.1 nebo 5.2.

5.1. Spalovací kelímek se vloží do kalibrované muflové pece zahřáté na 550 °C. Při této teplotě se spaluje, dokud nevznikne bílý, lehce šedý nebo načervenalý popel, který se zdá být prostý zuhelnatělých částic. Kelímek se vloží do exsikátoru, nechá se vychladnout a ihned se zváží.

5.2. Spalovací kelímek se vloží do kalibrované muflové pece zahřáté na 550 °C. Spaluje se tři hodiny. Kelímek se vloží do exsikátoru, nechá se vychladnout a ihned se zváží. Spaluje se dalších 30 minut, aby se zajistilo, že je dosažená hmotnost popela konstantní (úbytek hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími nesmí být větší než 1 mg).

6. **Výpočet výsledků**

Vypočte se hmotnost zbytku po odečtení hmotnosti kelímku (táry).

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Poznámky**

7.1. Popel *látek, které se obtížně zpopelňují*, se musí nejprve spalovat nejméně po dobu tří hodin. Po vychladnutí se přidá několik kapek 20 % roztoku dusičnanu amonného nebo vody (opatrně, aby nedošlo k rozptylu popela nebo ke tvoření hrudek). Po vysušení v sušárně se pokračuje v kalcinaci. Postup se opakuje podle potřeby tak dlouho, až je zpopelnění úplné.

7.2. V případě *látek, které jsou rezistentní na proces* popsaný v bodě 7.1, se postupuje takto: po spalování po dobu tří hodin se popel rozmíchá v teplé vodě a přefiltruje se přes malý bezpopelný filtr. Filtr s obsahem se dále spaluje v původním kelímku. Filtrát se převede do vychlazeného kelímku, odpaří do sucha, opět se spálí a popel se zváží.

7.3. V případě *olejů a tuků* se přesně naváží 25 g vzorku do kelímku vhodné velikosti. Zuhelnatí se zapálením látky proužkem bezpopelného filtračního papíru. Po spálení se zvlhčí co nejmenším množstvím vody. Vysuší se a spálí podle popisu v bodě 5.

M. STANOVENÍ OBSAHU POPELA NEROZPUSTNÉHO V KYSELINĚ CHLOROVODÍKOVÉ

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu minerálních látek nerozpustných v kyselině chlorovodíkové v krmivech. Podle druhu vzorku mohou být použity dvě různé metody.

1.1. *Metoda A:* použije se pro organické krmné suroviny a pro většinu krmných směsí.

1.2. *Metoda B:* použije se pro minerální krmné směsi a krmné směsi, u nichž je obsah látek nerozpustných v kyselině chlorovodíkové, stanovený metodou A, vyšší než 1 %.

2. **Princip**

2.1. *Metoda A:* vzorek se zpopelní, popel se povaří s kyselinou chlorovodíkovou a nerozpuštěný zbytek se přefiltruje a zváží.

2.2. *Metoda B:* vzorek se rozpustí v kyselině chlorovodíkové. Roztok se přefiltruje, zbytek na filtru se zpopelní a dále se postupuje podle metody A.

3. **Činidla**

3.1. Kyselina chlorovodíková 3 mol/l.

3.2. Kyselina trichloroctová, 20 % (w/v) roztok.

3.3. Kyselina trichloroctová, 1 % (w/v) roztok.

4. **Přístroje**

4.1. Topná deska.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatem.

4.3. Spalovací kelímky z křemene, porcelánu nebo platiny, buď pravoúhlé (asi 60 × 40 × 25 mm), nebo kulaté (průměr 60 až 75 mm, výška 20 až 40 mm).

4.4 Bezpopelné filtry.

5. **Postup**

5.1. *Metoda A:*

Vzorek se zpopelní podle postupu uvedeného v metodě pro stanovení obsahu hrubého popela. Může se použít rovněž popel získaný při uvedeném stanovení.

Popel se pomocí 75 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1) převede do 250–400 ml kádinky. Uvede se pomalu do varu a mírně se vaří patnáct minut. Teplý roztok se přefiltruje přes bezpopelný papírový filtr a zbytek na filtru se promyje teplou vodou do vymizení kyselé reakce. Filtr s promytým zbytkem se vysuší a potom zpopelní v předem zváženém kelímku při teplotě minimálně 550 °C a maximálně 700 °C. Nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se.

5.2. *Metoda B*

Do 250–400 ml kádinky se naváží 5 g vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se postupně 25 ml vody a 25 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1), promíchá se a nechá se stát, dokud neustane pěnění. Přidá se dalších 50 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1). Po ukončení vývoje plynu se kádinka umístí na vroucí vodní lázeň, kde se ponechá 30 minut nebo v případě potřeby déle, aby mohlo dojít k hydrolýze veškerého přítomného škrobu. Přefiltruje se za horka přes bezpopelný papírový filtr a filtr se promyje 50 ml teplé vody (viz poznámka 7). Filtr se zbytkem se vloží do spalovacího kelímku, vysuší se a potom zpopelní při teplotě minimálně 550 °C a maximálně 700 °C. Po spálení se popel převede pomocí 75 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1) do 250–400 ml kádinky; pokračuje se podle druhého odstavce bodu 5.1.

6. **Výpočet výsledků**

Vypočte se hmotnost zbytku po odečtení hmotnosti kelímku (táry). Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Poznámka**

Jestliže je filtrace obtížná, je možné nahradit 50 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1) 50 ml 20 % (w/v) roztoku kyseliny trichloroctové (bod 3.2) a zbytek na filtru promývat teplým 1 % roztokem kyseliny trichloroctové (bod 3.3).

N. STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÉHO FOSFORU

Celkový fosfor se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 15510 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, železa, zinku, mědi, manganu, kobaltu, molybdenu a olova metodou ICP-AES nebo

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 15621 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, síry, železa, zinku, mědi, manganu a kobaltu po tlakovém rozkladu metodou ICP-AES nebo

— fotometrickou metodou, jak je popsána níže.

FOTOMETRICKÁ METODA

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu celkového fosforu v krmivech. Je vhodná především pro analýzu produktů s nízkým obsahem fosforu. V určitých případech (u produktů s vysokým obsahem fosforu) je možné použít gravimetrickou metodu.

2. **Princip**

Vzorek se mineralizuje buď suchou cestou (v případě organických krmiv), nebo mokrou cestou (v případě minerálních směsí a tekutých krmiv) a převede se do kyselého roztoku. K tomuto roztoku se přidá molybdátovanadátové činidlo. Optická hustota žlutě zbarveného roztoku se měří při 430 nm pomocí spektrofotometru.

3. **Činidla**

3.1. Uhličitan vápenatý.

3.2. Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} = 1,10 g/ml (přibližně 6 mol/l).

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

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

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

3.6. Molybdátovanadátové činidlo: v odměrné baňce o objemu 1 litr se smíchá 200 ml roztoku heptamolybdenanu amonného (bod 3.6.1) s 200 ml roztoku vanadičnanu amonného (bod 3.6.2) a se 134 ml kyseliny dusičné (bod 3.4) a doplní se vodou po značku.

3.6.1. Roztok heptamolybdenanu amonného: 100 g heptamolybdenanu amonného $(NH_4)6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ se rozpustí v horké vodě. Přidá se 10 ml amoniaku (hustota 0,91 g/ml) a doplní se vodou na 1 litr.

3.6.2. Roztok vanadičnanu amonného: 2,35 g vanadičnanu amonného NH_4VO_3 se rozpustí ve 400 ml horké vody. Za stálého míchání se pomalu přilévá 20 ml zředěné kyseliny dusičné (7 ml HNO_3 (bod 3.4) + 13 ml H_2O) a doplní se vodou na 1 litr.

3.7. Standardní roztok 1 mg fosforu na ml: 4,387 g dihydrogenfosforečnanu draselného KH_2PO_4 se rozpustí ve vodě. Doplní se vodou na 1 litr.

4. **Přístroje**

4.1. Křemenné, porcelánové nebo platinové spalovací kelímky.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatem, regulovaná na teplotu 550 °C.

4.3. Kjeldahlova baňka, 250 ml.

4.4. Odměrné baňky a přesné pipety.

4.5. Spektrofotometr.

4.6. Zkumavky, průměr asi 16 mm, se zátkou o průměru 14,5 mm; objem: 25–30 ml.

5. **Postup**

5.1. *Příprava roztoku*

Podle druhu vzorku se připraví roztok způsobem, který je uveden v bodě 5.1.1 nebo 5.1.2.

5.1.1. Obvyklý postup

Do Kjeldahlovy baňky se naváží 1 g nebo větší množství vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 20 ml kyseliny sírové (bod 3.5), baňka se důkladně protřepe, aby se vzorek a kyselina dobře spojily a aby se zabránilo usazování vzorku na stěnách baňky; pak se roztok zahřeje a 10 minut se vaří na bodu varu. Po mírném ochlazení se přidají 2 ml kyseliny dusičné (bod 3.4); slabě se zahřeje a opět mírně ochladí. Pak se opět přidá trochu kyseliny dusičné (bod 3.4) a uvede se opět do varu. Postup se opakuje tolikrát, až se získá čirý roztok. Potom se ochladí, přidá se trochu vody, kapalina se převede do 500 ml odměrné baňky a Kjeldahlova baňka se vypláchne horkou vodou. Po ochlazení se doplní vodou po značku, homogenizuje a přefiltruje.

5.1.2. Vzorky, které obsahují organické látky, ale neobsahují dihydrogenfosforečnan vápenatý a hořečnatý

Do spalovacího kelímku se naváží přibližně 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg a dokonale se promíchá s 1 g uhličitanu vápenatého (bod 3.1). V muflové peci se spaluje při teplotě 550 °C tak dlouho, dokud se nezíská popel bílé nebo šedé barvy (malé množství uhlíkatých částic není na závadu). Popel se převede do 250 ml kádinky, přidá se 20 ml vody a potom se přidává kyselina chlorovodíková (bod 3.2), dokud neustane pěnění. Přidá se dalších 10 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.2). Kádinka se postaví na pískovou lázeň a odpaří se do sucha, aby se vyloučily křemičitany. Zbytek se rozpustí v 10 ml kyseliny dusičné (bod 3.3) a 5 minut vaří na pískové lázni nebo na topné desce tak, aby nedošlo k úplnému vysušení. Kapalina se převede do 500 ml odměrné baňky a kádinka se několikrát vymyje horkou vodou. Po ochlazení se doplní vodou po značku, homogenizuje a přefiltruje.

5.2. *Vývoj zbarvení a měření optické hustoty*

Alikvotní množství filtrátu připraveného podle bodu 5.1.1 nebo 5.1.2 se zředí tak, aby koncentrace fosforu byla maximálně 40 µg/ml. 10 ml tohoto roztoku se odpipetuje do zkumavky (bod 4.6) a přidá se 10 ml molybdátovanadátového činidla (bod 3.6). Homogenizuje se a nechá se stát minimálně po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Pak se měří optická hustota ve spektrofotometru při 430 nm proti roztoku připravenému z 10 ml vody a 10 ml molybdátovanadátového činidla (bod 3.6).

5.3. *Kalibrační křivka*

Ze standardního roztoku (bod 3.7) se připraví roztoky, které obsahují 5, 10, 20, 30 a 40 µg fosforu na jeden ml. Ke každým 10 ml těchto roztoků se přidá 10 ml molybdátovanadátového činidla (bod 3.6). Homogenizuje se a nechá se stát minimálně po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Pak se měří optická hustota, jak je uvedeno v bodě 5.2. Kalibrační křivka se vytvoří vynesením hodnot optické hustoty proti odpovídajícím množstvím fosforu. Křivka je lineární při koncentraci fosforu 0–40 µg/ml.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah fosforu ve zkušebním vzorku se stanoví pomocí kalibrační křivky.

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit:

— 3 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu fosforu méně než 5 %,

— 0,15 % v absolutní hodnotě u obsahu fosforu 5 % či více.

O. STANOVENÍ OBSAHU VE VODĚ ROZPUSTNÝCH CHLORIDŮ

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů obvykle vyjadřovaných jako chlorid sodný. Je vhodná pro všechna krmiva.

2. **Princip**

Chloridy se rozpustí ve vodě. Jestliže produkt obsahuje organickou hmotu, roztok se vyčeří. Roztok se mírně okyselí kyselinou dusičnou a chloridy se vysrážejí pomocí roztoku dusičnanu stříbrného jako chlorid stříbrný. Přebytek dusičnanu stříbrného se titruje roztokem thiokyanatanu amonného podle Volhardovy metody.

3. **Činidla**

3.1. Roztok thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l.

3.2. Roztok dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l.

3.3. Nasycený roztok síranu železitoamonného $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

3.4. Kyselina dusičná, hustota: 1,38 g/ml.

3.5. Diethylether.

3.6. Aceton.

3.7. Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.

3.8. Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g hexakyanidoželeznatanu draselného $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Doplní se vodou na 100 ml.

3.9. Aktivní uhlí, chloridů prosté a neabsorbující chloridy.

4. **Přístroje**

Míchací zařízení: přibližně 35 až 40 ot/min.

5. **Postup**

5.1. *Příprava roztoku*

Příprava vzorku závisí na druhu vzorku a roztok se připraví podle bodu 5.1.1, 5.1.2 nebo 5.1.3.

Současně se provede *slepá zkouška* bez zkoušeného vzorku.

5.1.1. Vzorky prosté organické hmoty

Do 500 ml odměrné baňky se naváží maximálně 10 g vzorku s přesností na 1 mg tak, aby navážka obsahovala nejvýše 3 g ve vodě rozpustných chloridů, přidá se 400 ml vody o teplotě přibližně 20 °C a míchá se 30 minut na míchacím zařízení. Potom se doplní po značku, homogenizuje a přefiltruje.

5.1.2. Vzorky obsahující organickou hmotu, kromě produktů uvedených v bodě 5.1.3

Do 500 ml odměrné baňky se naváží přibližně 5 g vzorku s přesností na 1 mg a 1 g aktivního uhlí. Přidá se 400 ml vody o teplotě přibližně 20 °C a 5 ml Carrezova činidla I (bod 3.7), asi 30 sekund se míchá, pak se přidá 5 ml Carrezova činidla II (bod 3.8). Míchá se 30 minut na míchacím zařízení, potom se doplní po značku, homogenizuje a přefiltruje.

5.1.3. Tepelně opracovaná krmiva, lněné pokrutiny, lněná moučka, produkty bohaté na lněnou moučku a jiné produkty bohaté na sliz nebo koloidní látky (např. dextrinovaný škrob)

Roztok se připraví podle bodu 5.1.2, ale nefiltruje se. Dekantuje se (v případě potřeby odstředí). Do 200 ml odměrné baňky se odpipetuje 100 ml supernatantu, smíchá se s acetonem (bod 3.6) a doplní se tímto rozpouštědlem po značku, homogenizuje se a přefiltruje.

5.2. *Titrace*

Do Erlenmeyerovy baňky se odpipetuje 25–100 ml filtrátu (podle předpokládaného obsahu chloru) získaného podle bodu 5.1.1, 5.1.2 nebo 5.1.3. Alikvotní část nesmí obsahovat více než 150 mg chloru (Cl). V případě potřeby se doplní vodou na minimálně 50 ml, přidá se 5 ml kyseliny dusičné (bod 3.4), 2 ml nasyceného roztoku síranu železitoamonného (bod 3.3) a dvě kapky roztoku thiokyanatanu amonného (bod 3.1) z byrety naplněné ke značce nula. Jinou byretou se přidá roztok dusičnanu stříbrného (bod 3.2) tak, aby se získal přebytek 5 ml. Dále se přidá 5 ml diethyletheru (bod 3.5) a silně se protřepe, aby sraženina dobře koagulovala. Přebytek dusičnanu stříbrného se titruje s roztokem thiokyanatanu amonného (bod 3.1), dokud není dosaženo červenohnědého zabarvení, které vydrží jednu minutu.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah ve vodě rozpustných chloridů (X) vyjádřených jako procento chloridu sodného se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

V_1 = přidaný roztok dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l v ml

V_2 = roztok thiokyanatanu amonného 0,1 mol/l použitý pro titraci v ml

m = hmotnost vzorku v alikvotní části v g.

Jestliže byl při slepé zkoušce roztok dusičnanu stříbrného 0,1 mol/l spotřebován, odečte se tato hodnota z objemu ($V_1 - V_2$).

7. **Poznámky**

7.1. Titraci lze provádět také potenciometricky.

7.2. V případě produktů velmi bohatých na oleje a tuky se vzorek nejprve odtuční diethyletherem nebo petroletherem.

7.3. V případě rybích mouček lze titraci provést Mohrovou metodou.“

PŘÍLOHA IV

„PŘÍLOHA IV

METODY ANALÝZY PRO KONTROLU OBSAHU POVOLENÝCH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK V KRMIVECH

A) STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU A

Obsah vitaminu A se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17547 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu vitaminu A, E a D [1] – Metoda využívající extrakci a přečištění na pevné fázi (SPE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitaminu A (retinolu) v krmivech. Vitamin A zahrnuje all-*trans*-retinyl-alkohol a jeho *cis*-izomery, které se stanoví touto metodou. Obsah vitaminu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (IU) na kilogram. Jedna IU odpovídá aktivitě 0,300 µg all-*trans*-vitamin-A-alkoholu nebo 0,344 µg all-*trans*-vitamin-A-acetátu nebo 0,550 µg all-*trans*-vitamin-A-palmitátu.

Mez stanovitelnosti je 2 000 IU vitaminu A/kg.

2. **Princip**

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin A se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a, pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitaminu A se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Chromatografické parametry jsou vybrány tak, aby nedocházelo k separaci all-*trans*-vitamin-A-alkoholu a jeho *cis*-izomerů.

3. **Činidla**

3.1. Ethanol, σ = 96 %

3.2. Petrolether, bod varu 40–60 °C

3.3. Methanol

3.4. Roztok hydroxidu draselného, c = 50 g/100 ml

3.5. Roztok askorbátu sodného, c = 10 g/100 ml (viz poznámky v bodě 7.7)

3.6. Sulfid sodný, $Na_2S{\cdot}xH_2O$ (x = 7–9)

3.6.1. Roztok sulfidu sodného, c = 0,5 mol/l v glycerolu, β = 120 g/l (pro x = 9) (viz poznámky v bodě 7.8)

3.7. Roztok fenolftaleinu, c = 2 g/100 ml v ethanolu (bod 3.1)

3.8. 2-Propanol

3.9. Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (bod 3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude určen podle charakteristiky použité kolony.

3.10. Dusík, prostý kyslíku

[1] Metoda analýzy stanovená v normě EN 17547 se označuje jako alternativní metoda, která se má použít pro účely úřední kontroly pro stanovení obsahu vitaminu A a E namísto metody popsané pro stanovení obsahu vitaminu A v části A této přílohy a pro stanovení obsahu vitaminu E v části B této přílohy.

3.11. All-*trans*-vitamin-A-acetát, extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. 2,80 × 10^6 IU/g

3.11.1. Zásobní roztok all-*trans*-vitamin-A-acetátu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg vitamin-A-acetátu (bod 3.11). Rozpustí se v 2-propanolu (bod 3.8) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 1 400 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.1.

3.12. All-*trans*-vitamin-A-palmitát, extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. 1,80 × 10^6 IU/g

3.12.1. Zásobní roztok all-*trans*-vitamin-A-palmitát: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 80 mg vitamin-A-palmitátu (bod 3.12). Rozpustí se v 2-propanolu (bod 3.8) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 1 400 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5)

4. **Přístroje**

4.1. Vakuová rotační odparka

4.2. Nádobí z tmavého skla

4.2.1. Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem

4.2.2. Odměrné baňky s úzkým hrdlem a skleněnou zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml

4.2.3. Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou

4.2.4. Hruškovité baňky, 250 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem

4.3. Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se skleněným zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu

4.4. Skládaný filtrační papír pro separaci fází, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem

4.5.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná (kritérium účinnosti: pouze jediný pík pro všechny izomery retinolu za podmínek HPLC)

4.5.2. UV nebo fluorescenční detektor s nastavitelnou vlnovou délkou

4.6. Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami

4.7. Vodní lázeň s magnetickou míchačkou

4.8. Extrakční zařízení (viz obrázek 1) sestávající z/ze:

4.8.1. Skleněného válce o objemu 1 litr opatřeného skleněným zábrusovým hrdlem a zátkou

4.8.2. Vkladatelného zařízení se skleněným zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má spodní konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu kapaliny z válce do dělicí nálevky.

5. **Postup**

Poznámka: Vitamin A je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny úkony se provádí bez přístupu světla (používá se nádobí z tmavého skla nebo se skleněné nádobí chrání před světlem hliníkovou fólií) a kyslíku (pod dusíkem). Vzduch nad kapalinou se během extrakce vytěsní dusíkem (aby nedošlo k přetlakování, je nutno občas uvolnit zátku).

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s oky o velikosti 1 mm a aby během přípravy nedošlo k jeho zahřátí. Mletí musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitaminu A. Pokud je rozdělení velikosti částic přiměřené (např. premixy a doplňkové látky), vzorek (vzorky) se nemele (nemelou).

5.2. *Saponifikace*

Podle obsahu vitaminu A ve vzorku se s přesností na 1 mg naváží 2–25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1). V případě nízkých koncentrací lze hmotnost vzorku zvýšit, aby byl v navážce vzorku dostatek částic. Za intenzivního míchání se přidá 130 ml ethanolu (bod 3.1), přibližně 100 mg BHT (bod 3.13), 2 ml roztoku askorbátu sodného (bod 3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného bod (bod 3.6). Baňka se připojí k chladiči (bod 4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickou míchačkou (bod 4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (bod 4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne přibližně 20 ml vody a obsah baňky se nechá vychladnout na laboratorní teplotu.

5.3. *Extrakce*

Saponifikovaný roztok se dekantací a propláchnutím celkem 250 ml vody převede kvantitativně do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (bod 4.8). Saponifikační baňka se postupně opláchne 25 ml ethanolu (bod 3.1) a 100 ml petroletheru (bod 3.2) a oba oplachy se převedou do dělicí nálevky nebo do extrakčního zařízení. Konečný poměr vody a ethanolu v kombinovaných roztocích musí být asi 2:1. Roztok se dvě minuty intenzivně třepe a potom se nechá dvě minuty stát.

5.3.1. Extrakce v dělicí nálevce (bod 4.2.3)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (bod 4.2.3). Extrakce se opakuje dvakrát se 100 ml petroletheru (bod 3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2).

Spojené extrakty v dělicí nálevce se dvakrát promyjí mírným kroužením (aby nevznikala emulze) 100 ml vody a potom se opakovaně protřepávají se 100 ml vody, dokud voda nezůstane po přidání roztoku fenolftaleinu (bod 3.7) bezbarvá (obvykle stačí čtyři promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro separaci fází (bod 4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka a filtr se opláchne 50 ml petroletheru (bod 3.2). Baňka se petroletherem (bod 3.2) doplní po značku a důkladně promíchá.

5.3.2. Extrakce v extrakčním zařízení (bod 4.8)

Po separaci vrstev (viz poznámka 7.3) se ze skleněného válce (bod 4.8.1) odstraní zátka a místo ní se vloží vkladatelné zařízení se skleněným zábrusem (bod 4.8.2). Spodní strana nastavitelné U-trubičky se umístí tak, aby byla právě nad rozhraním. Za použití tlaku dusíku (přiváděného postranním raménkem) se převede horní petroletherová vrstva do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (bod 3.2), skleněný válec se zazátkuje a důkladně protřepe. Po separaci vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (bod 3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2). Horní petroletherová vrstva se vždy přidá k předchozí do dělicí nálevky.

Spojené extrakty petroletheru v dělicí nálevce se promyjí, jak je popsáno v bodě 5.3.1, a postupuje se dále podle popisu v uvedeném bodě.

5.4. *Příprava roztoku vzorku pro stanovení HPLC*

Alikvotní část roztoku petroletheru (podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2) se odpipetuje do 250 ml hruškovité baňky (bod 4.2.4). Rozpouštědlo se na rotační odparce (bod 4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (bod 3.10) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.10) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu (bod 3.3) (výsledná koncentrace vitaminu A musí být v rozsahu 5–30 IU/ml).

5.5. *Stanovení pomocí HPLC*

Vitamin A se separuje na koloně C_{18} s reverzní fází (bod 4.5.1) a jeho koncentrace se měří UV detektorem (325 nm) nebo fluorescenčním detektorem (excitace: 325 nm, emise: 475 nm) (bod 4.5.2).

Do přístroje se nastřikuje alikvotní část (např. 20 µl) methanolického roztoku získaného podle bodu 5.4 a eluuje se mobilní fází (bod 3.9). Průměrná hodnota výšek (ploch) píků se vypočte z několika opakovaných nástřiků téhož roztoku vzorku nebo kalibračních roztoků (bod 5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučené; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.9):	směs methanolu (bod 3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v).
Průtok:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV detektor (325 nm) nebo fluorescenční detektor (excitace: 325 nm/emise: 475 nm)

5.6. *Kalibrace*

5.6.1. Příprava pracovních standardních roztoků

Do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1) se odpipetuje 20 ml zásobního roztoku vitamin-A-acetátu (bod 3.11.1) nebo 20 ml zásobního roztoku vitamin-A-palmitátu (bod 3.12.1) a hydrolyzuje se podle bodu 5.2, ale bez přidání BHT. Potom se provede extrakce petroletherem (bod 3.2) podle bodu 5.3 a doplní se na 500 ml petroletherem (bod 3.2). 100 ml tohoto extraktu se odpaří na rotační odparce téměř do sucha (viz 5.4), zbylé rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.10) a odparek se rozpustí v 10,0 ml methanolu (bod 3.3). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 560 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.3. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

Do 20 ml odměrné baňky se odpipetují 2,0 ml tohoto pracovního standardního roztoku, baňka se doplní po značku methanolem (bod 3.3) a promíchá. Nominální koncentrace vitaminu A v tomto zředěném pracovním standardním roztoku je 56 IU/ml.

5.6.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/5,0 a 10,0 ml zředěného pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace vitaminu A v těchto roztocích jsou 2,8/5,6/14,0 a 28,0 IU/ml.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka, přičemž se použijí výsledky UV kontroly (bod 5.6.3.3).

5.6.3. UV standardizace standardních roztoků

5.6.3.1. Zásobní roztok vitamin-A-acetátu

Do 50 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) se odpipetují 2,0 ml zásobního roztoku vitamin-A-acetátu (bod 3.11.1) a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 56 IU/ml. Do 25 ml odměrné baňky se odpipetují 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamin-A-acetátu a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 6,72 IU/ml. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (bod 3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitaminu A:

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

$$(E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}} \text{ pro vitamin A – acetát} = 1\,530 \text{ při 326 nm v 2 – propanolu})$$

5.6.3.2. Zásobní roztok vitamin-A-palmitátu

Do 50 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) se odpipetují 2,0 ml zásobního roztoku vitamin-A-palmitátu (bod 3.12.1) a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 56 IU/ml. Do 25 ml odměrné baňky se odpipetují 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamin-A-palmitátu a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 6,72 IU/ml. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (bod 3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitaminu A:

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

$$(E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}} \text{ pro vitamin A – palmitát} = 957 \text{ při 326 nm v 2 – propanolu})$$

5.6.3.3. Pracovní standardní roztok vitaminu A

Do 50 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) se odpipetují 3,0 ml nezředěného pracovního standardního roztoku vitaminu A připraveného podle bodu 5.6.1 a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml tohoto roztoku a doplní se po značku 2-propanolem (bod 3.8). Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 6,72 IU/ml. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (bod 3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitaminu A:

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

$$(E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}} \text{ pro vitamin A – alkohol} = 1\,821 \text{ při 325 nm v 2 – propanolu})$$

6. **Výpočet výsledků**

Koncentrace vitaminu A v roztoku vzorku v IU/ml se stanoví porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.6.2) podle průměrných hodnot výšek (ploch) píků.

Obsah vitaminu A (w) v IU/kg vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

c = koncentrace vitaminu A v roztoku vzorku (bod 5.4) v IU/ml

V_1 = objem roztoku vzorku (bod 5.4) v ml

V_2 = objem alikvotní části podle bodu 5.4 v ml

m = hmotnost navážky vzorku v g

7. **Poznámky**

7.1. U vzorků s nízkou koncentrací vitaminu A může být užitečné spojit extrakty petroletheru ze dvou saponifikovaných vzorků (navážka: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení HPLC.

7.2. Hmotnost vzorku pro analýzu nesmí obsahovat více než 2 g tuku.

7.3. Pokud nedojde k separaci fází, přidá se přibližně 10 ml ethanolu (bod 3.1), aby se odstranila emulze.

7.4. U oleje z trescích jater a ostatních čistých tuků se doba saponifikace prodlouží na 45–60 minut.

7.5. Místo BHT lze použít hydrochinon.

7.6. Pro separaci izomerů retinolu je možné použít běžnou fázovou kolonu. V tomto případě je však pro výpočet nutné sečíst výšky (plochy) píků všech *cis*- a *trans*-izomerů.

7.7. Místo roztoku askorbátu sodného lze použít přibližně 150 mg kyseliny askorbové.

7.8. Místo roztoku sulfidu sodného lze použít přibližně 50 mg EDTA.

7.9. V případě analýzy na obsah vitaminu A v mléčných krmných směsích je třeba věnovat zvláštní pozornost:

— při saponifikaci (bod 5.2): v závislosti na množství tuku ve vzorku může být nutné zvýšit množství roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4),

— při extrakci (bod 5.3): v důsledku přítomnosti emulzí může být nutné upravit poměr vody a ethanolu 2:1.

Pro kontrolu toho, zda použitá metoda analýzy poskytuje spolehlivé výsledky, pokud jde o tuto specifickou matrici (mléčné krmné směsi), se provede zkouška na výtěžnost u dodatečné navážky vzorku. Pokud je výtěžnost nižší než 80 %, výsledek analýzy je třeba korigovat na výtěžnost.

8. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

9. **Výsledky kolaborativní studie** ([2])

	Premix	Premix krmiva	Minerální koncentrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
průměr [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
R [IU/kg]	3,81 x 106	0,193 x 106	129 640	64 568	10 119

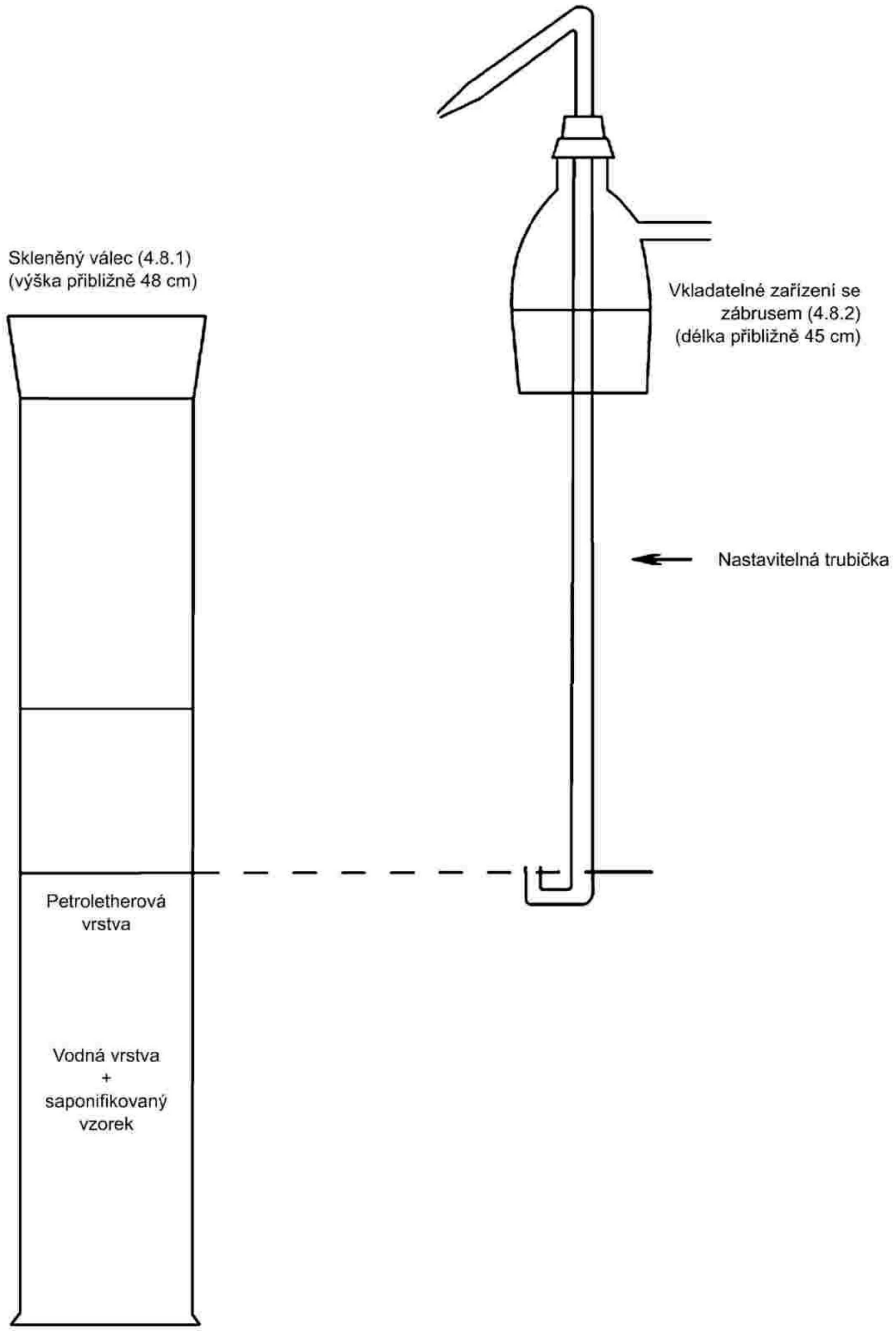
([2]) Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: počet laboratoří
n: počet jednotlivých hodnot
sr: standardní odchylka opakovatelnosti
sR: standardní odchylka reprodukovatelnosti
r: opakovatelnost
R: reprodukovatelnost
CVr: variační koeficient opakovatelnosti
CVR: variační koeficient reprodukovatelnosti

Obrázek 1

Extrakční zařízení (4.8)



B) STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU E

Obsah vitaminu E se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17547 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu vitaminu A, E a D [3] – Metoda využívající extrakci a přečištění na pevné fázi (SPE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitaminu E v krmivech. Obsah vitaminu E se vyjadřuje jako mg DL-α-tokoferol-acetátu na kg. 1 mg DL-α-tokoferol-acetátu odpovídá 0,91 mg DL-α-tokoferolu (vitamin E).

Mez stanovitelnosti je 2 mg vitaminu E/kg. Tato mez stanovitelnosti je dosažitelná pouze s fluorescenčním detektorem. Při použití UV detektoru je mez stanovitelnosti 10 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin E se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a, pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitaminu E se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s fluorescenční nebo UV detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Ethanol, σ = 96 %

3.2. Petrolether, bod varu 40–60 °C

3.3. Methanol

3.4. Roztok hydroxidu draselného, c = 50 g/100 ml

3.5. Roztok askorbátu sodného, c = 10 g/100 ml (viz poznámky v bodě 7.7)

3.6. Sulfid sodný, $Na_2S{\cdot}xH_2O$ (x = 7–9)

3.6.1. Roztok sulfidu sodného, c = 0,5 mol/l v glycerolu, β = 120 g/l (pro x = 9) (viz poznámky v bodě 7.8)

3.7. Roztok fenolftaleinu, c = 2 g/100 ml v ethanolu (bod 3.1)

3.8. Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (bod 3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude určen podle charakteristiky použité kolony.

3.9. Dusík, prostý kyslíku

3.10. DL-α-tokoferol-acetát, extra čistý, s ověřenou aktivitou

3.10.1. Zásobní roztok DL-α-tokoferol-acetátu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL-α-tokoferol-acetátu (bod 3.10). Rozpustí se v ethanolu (bod 3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL-α-tokoferol-acetátu. (UV kontrola – viz bod 5.6.1.3; stabilizace – viz poznámky v bodě 7.4).

[3] Metoda analýzy stanovená v normě EN 17547 se označuje jako alternativní metoda, která se má použít pro účely úřední kontroly pro stanovení obsahu vitaminu A a E namísto metody popsané pro stanovení obsahu vitaminu A v části A této přílohy a pro stanovení obsahu vitaminu E v části B této přílohy.

3.11. DL-α-tokoferol, extra čistý, s ověřenou aktivitou

3.11.1. Zásobní roztok DL-α-tokoferolu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 100 mg DL-α-tokoferolu bod (bod 3.11). Rozpustí se v ethanolu (bod 3.1) a doplní se jím po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL-α-tokoferolu. (UV kontrola – viz bod 5.6.2.3; stabilizace – viz poznámky 7.4).

3.12. 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5)

4. **Přístroje**

4.1. Rotační filmová odparka

4.2. Nádobí z tmavého skla

4.2.1. Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem

4.2.2. Odměrné baňky s úzkým hrdlem a skleněnou zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml

4.2.3. Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou

4.2.4. Hruškovité baňky, 250 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem

4.3. Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se skleněným zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu

4.4. Skládaný filtrační papír pro separaci fází, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem

4.5.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná

4.5.2. Fluorescenční nebo UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou

4.6. Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami

4.7. Vodní lázeň s magnetickou míchačkou

4.8. Extrakční zařízení (viz obrázek 2) sestávající z/ze:

4.8.1. Skleněného válce o objemu 1 litr opatřeného skleněným zábrusovým hrdlem a zátkou

4.8.2. Vkladatelného zařízení se skleněným zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má spodní konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu kapaliny z válce do dělicí nálevky.

5. **Postup**

Poznámka: Vitamin E je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny úkony se provádí bez přístupu světla (používá se nádobí z tmavého skla nebo se skleněné nádobí chrání před světlem hliníkovou fólií) a kyslíku (pod dusíkem). Vzduch nad kapalinou se během extrakce vytěsní dusíkem (aby nedošlo k přetlakování, je nutno občas uvolnit zátku).

5.1. *Příprava vzorku*

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítem s oky o velikosti 1 mm a aby během přípravy nedošlo k jeho zahřátí. Mletí musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitaminu E.

5.2. *Saponifikace*

Podle obsahu vitaminu E ve vzorku se s přesností na 0,01 g naváží 2–25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1). Za intenzivního míchání se přidá 130 ml ethanolu (bod 3.1), přibližně 100 mg BHT (bod 3.12), 2 ml roztoku askorbátu sodného bod (bod 3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (bod 3.6). Baňka se připojí k chladiči (bod 4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickou míchačkou (bod 4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (bod 4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne přibližně 20 ml vody a obsah baňky se nechá vychladnout na laboratorní teplotu.

5.3. *Extrakce*

Saponifikovaný roztok se dekantací a propláchnutím celkem 250 ml vody převede kvantitativně do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (bod 4.8). Saponifikační baňka se postupně opláchne 25 ml ethanolu (bod 3.1) a 100 ml petroletheru (bod 3.2) a oba oplachy se převedou do dělicí nálevky nebo do extrakčního zařízení. Konečný poměr vody a ethanolu v kombinovaných roztocích musí být asi 2:1. Roztok se dvě minuty intenzivně třepe a potom se nechá dvě minuty stát.

5.3.1. Extrakce v dělicí nálevce (bod 4.2.3)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (bod 4.2.3). Extrakce se opakuje dvakrát se 100 ml petroletheru (bod 3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2).

Spojené extrakty v dělicí nálevce se dvakrát promyjí mírným kroužením (aby nevznikala emulze) 100 ml vody a potom se opakovaně protřepávají se 100 ml vody, dokud voda nezůstane po přidání roztoku fenolftaleinu (bod 3.7) bezbarvá (obvykle stačí čtyři promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro separaci fází (bod 4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka a filtr se opláchne 50 ml petroletheru (bod 3.2). Baňka se petroletherem (bod 3.2) doplní po značku a důkladně promíchá.

5.3.2. Extrakce v extrakčním zařízení (bod 4.8)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se ze skleněného válce (bod 4.8.1) odstraní zátka a místo ní se vloží vkladatelné zařízení se skleněným zábrusem (bod 4.8.2). Spodní strana nastavitelné U-trubičky se umístí tak, aby byla právě nad rozhraním. Za použití tlaku dusíku (přiváděného postranním raménkem) se převede horní petroletherová vrstva do 1 000 ml dělicí nálevky (bod 4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (bod 3.2), skleněný válec se zazátkuje a důkladně protřepe. Po separaci vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (bod 3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2). Horní petroletherová vrstva se vždy přidá k předchozí do dělicí nálevky.

Spojené extrakty petroletheru v dělicí nálevce se promyjí, jak je popsáno v bodě 5.3.1, a postupuje se dále podle popisu v uvedeném bodě.

5.4. *Příprava roztoku vzorku pro stanovení HPLC*

Alikvotní část roztoku petroletheru (podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2) se odpipetuje do 250 ml hruškovité baňky (bod 4.2.4). Rozpouštědlo se na rotační odparce (bod 4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (bod 3.9) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.9) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu (bod 3.3) (koncentrace DL-α-tokoferolu musí být v rozmezí 5 µg/ml až 30 µg/ml).

5.5. *Stanovení pomocí HPLC*

Vitamin E se separuje na koloně C_{18} s reverzní fází (bod 4.5.1) a jeho koncentrace se měří fluorescenčním detektorem (excitace: 295 nm, emise: 330 nm) nebo UV detektorem (292 nm) (bod 4.5.2).

Do přístroje se nastřikuje alikvotní část (např. 20 µl) methanolického roztoku získaného podle bodu 5.4 a eluuje se mobilní fází (bod 3.8). Průměrná hodnota výšek (ploch) píků se vypočte z několika opakovaných nástřiků téhož roztoku vzorku nebo kalibračních roztoků (bod 5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučené; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 5 nebo 10 µm nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.8):	Směs methanolu (bod 3.3) a vody např. 980 + 20 (v + v).
Průtok:	1–2 ml/min
Detektor (bod 4.5.2):	fluorescenční detektor (excitace: 295 nm/ emise: 330 nm) nebo UV detector (292 nm)

5.6. *Kalibrace (DL-α-tokoferol-acetát nebo DL-α-tokoferol)*

5.6.1. Standardní DL-α-tokoferol-acetát

5.6.1.1. Příprava pracovního standardního roztoku

Do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (bod 4.2.1) se odpipetuje 25 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferol-acetátu (bod 3.10.1) a hydrolyzuje se podle bodu 5.2. Potom se provede extrakce petroletherem (bod 3.2) podle bodu 5.3 a doplní se na 500 ml petroletherem. 25 ml tohoto extraktu se odpaří na rotační odparce téměř do sucha (viz bod 5.4), zbylé rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.9) a odparek se rozpustí v 25,0 ml methanolu (bod 3.3). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 45,5 µg DL-α-tokoferolu/ml, což odpovídá 50 µg DL-α-tokoferol-acetátu/ml. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

5.6.1.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/4,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,5/5,0/10,0 a 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol-acetátu, tj. 2,28/4,55/9,10 a 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolu.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka.

5.6.1.3. UV standardizace zásobního roztoku DL-α-tokoferol-acetátu (bod 3.10.1)

Do 25,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferol-acetátu (bod 3.10.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (bod 3.1) v rozmezí 250–320 nm.

Absorpční maximum je při 284 nm:

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

Při tomto ředění musí být získaná hodnota extinkce 0,84–0,88.

5.6.2. Standardní DL-α-tokoferol

5.6.2.1. Příprava pracovního standardního roztoku

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 2 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (bod 3.11.1), zředí se methanolem (bod 3.3) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace tohoto roztoku je 40 µg DL-α-tokoferolu/ml, což odpovídá 44,0 µg DL-α-tokoferol-acetátu/ml. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

5.6.2.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/4,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,0/4,0/8,0 a 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolu, tj. 2,20/4,40/8,79 a 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol-acetátu.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka.

5.6.2.3. UV standardizace zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (bod 3.11.1)

Do 25,0 ml odměrné baňky se odpipetuje 2,0 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (bod 3.11.1) a doplní se po značku ethanolem. Na spektrofotometru (bod 4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti ethanolu (bod 3.1) v rozmezí 250–320 nm. Absorpční maximum je při 292 nm:

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

Při tomto ředění musí být získaná hodnota extinkce 0,6.

6. **Výpočet výsledků**

Z průměrné výšky (plochy) píků vitaminu E v roztoku vzorku se stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml (počítáno jako DL-α-tokoferol-acetát) porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.6.1.2 nebo 5.6.2.2).

Obsah vitaminu E (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

c = koncentrace vitaminu E (jako DL-α-tokoferol-acetátu) v roztoku vzorku (bod 5.4) v µg/ml

V_1 = objem roztoku vzorku (bod 5.4) v ml

V_2 = objem alikvotní části (bod 5.4) v ml

m = hmotnost navážky vzorku v g

7. **Poznámky**

7.1. U vzorků s nízkou koncentrací vitaminu E může být užitečné spojit extrakty petroletheru ze dvou saponifikovaných vzorků (navážka: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení HPLC.

7.2. Hmotnost vzorku pro analýzu nesmí obsahovat více než 2 g tuku.

7.3. Pokud nedojde k separaci fází, přidá se přibližně 10 ml ethanolu (bod 3.1), aby se odstranila emulze.

7.4. Po spektrofotometrickém měření roztoku DL-α-tokoferol-acetátu nebo DL-α-tokoferolu podle bodů 5.6.1.3 nebo 5.6.2.3 se přidá do roztoku (bod 3.10.1 nebo 3.10.2) přibližně 10 mg BHT (bod 3.12) a roztok se skladuje v chladničce (maximální doba skladovatelnosti činí čtyři týdny).

7.5. Místo BHT lze použít hydrochinon.

7.6. Separace α-, β-, γ- a δ-tokoferolu je možná s použitím běžné fázové kolony.

7.7. Místo roztoku askorbátu sodného lze použít přibližně 150 mg kyseliny askorbové.

7.8. Místo roztoku sulfidu sodného lze použít přibližně 50 mg EDTA.

7.9. Vitamin-E-acetát hydrolyzuje za alkalických podmínek velmi rychle, a proto je velmi citlivý na oxidaci, zejména v přítomnosti stopových prvků, jako je železo nebo měď. V případě stanovení vitaminu E v premixech s obsahem vyšším než 5 000 mg/kg by důsledkem mohl být rozklad vitaminu E. Proto se pro potvrzení doporučuje metoda HPLC včetně enzymatického rozkladu vitaminu E bez alkalické saponifikace.

8. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

9. **Výsledky kolaborativní studie** ([4])

	Premix	Premix krmiva	Minerální koncentrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
průměr [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: počet laboratoří

n: počet jednotlivých hodnot

s_r: standardní odchylka opakovatelnosti

s_R: standardní odchylka reprodukovatelnosti

r: opakovatelnost

R: reprodukovatelnost

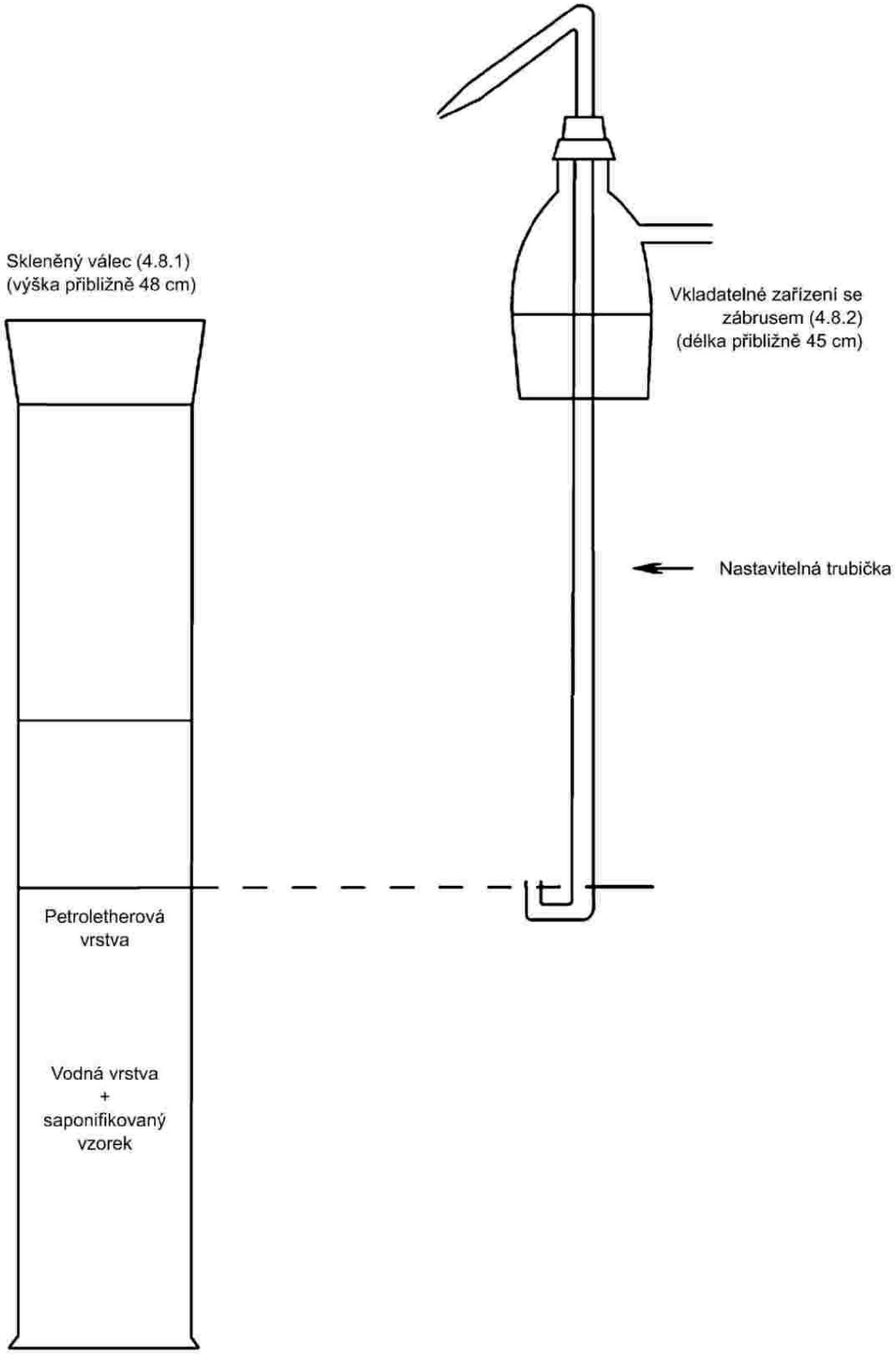
CV_r: variační koeficient opakovatelnosti

CV_R: variační koeficient reprodukovatelnosti

([4]) Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 2

Extrakční zařízení (4.8)



C) STANOVENÍ OBSAHU STOPOVÝCH PRVKŮ ŽELEZA, MĚDI, MANGANU A ZINKU

Obsah železa, mědi, manganu a zinku se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 15510 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, železa, zinku, mědi, manganu, kobaltu, molybdenu a olova metodou ICP-AES nebo

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 15621 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, síry, železa, zinku, mědi, manganu a kobaltu po tlakovém rozkladu metodou ICP-AES nebo

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17053 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení stopových prvků, těžkých kovů a dalších prvků v krmivech metodou ICP-MS (multimetoda) nebo

— metodou analýzy stanovenou v normě EN ISO 6869 Krmiva – Stanovení obsahů vápníku, mědi, železa, hořčíku, manganu, draslíku, sodíku a zinku – Metoda atomové absorpční spektrometrie nebo

— metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie (FAAS), jak je popsána v bodech 1 až 8 níže.

(1) **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení stopových prvků železa, mědi, manganu a zinku v krmivech ([5]). Meze stanovitelnosti jsou:

— železo (Fe): 20 mg/kg

— měď (Cu): 10 mg/kg

— mangan (Mn): 20 mg/kg

— zinek (Zn): 20 mg/kg

2. **Princip**

Vzorek se převede po destrukci organické hmoty (pokud je obsažena) do roztoku kyselinou chlorovodíkovou. Prvky železo, měď, mangan a zinek se stanoví po příslušném zředění atomovou absorpční spektrofotometrií.

3. **Činidla**

Úvodní poznámky

Pro přípravu činidel a analytických roztoků se použije voda, dvakrát destilovaná ve skleněném destilačním přístroji (borosilikátové nebo křemičité sklo) nebo po dvojím průchodu přes ionex, která prokazatelně neobsahuje kationty.

Činidla musí být nejméně analytické čistoty. Nepřítomnost prvků, které mají být stanoveny, musí být kontrolována slepou zkouškou. Pokud je to nutné, musí být činidla přečištěna.

Místo standardních roztoků popsaných níže mohou být použity komerční standardní roztoky za předpokladu, že mají deklarovaný obsah a před použitím byly překontrolovány.

3.1. Kyselina chlorovodíková (d: 1,19 g/ml).

3.2. Kyselina chlorovodíková (6 mol/l).

3.3. Kyselina chlorovodíková (0,5 mol/l).

3.4. Kyselina fluorovodíková 38–40 % (v/v) s obsahem železa (Fe) pod 1 mg/l a zbytkem po odpaření menším než 10 mg (jako sulfát)/l.

([5]) Tato metoda byla validována na základě kolaborativní zkoušky pro různé matrice krmiv. Další informace jsou k dispozici na adrese: https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation

3.5. Kyselina sírová (d: 1,84 g/ml).

3.6. Peroxid vodíku (přibližně 100 objemů kyslíku (30 % hmotnostních)).

3.7. Standardní roztok železa (1 000 µg Fe/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok: v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 200 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) se rozpustí 1 g železného drátu, přidá se 16 ml peroxidu vodíku (bod 3.6) a doplní se po značku vodou.

3.7.1. Pracovní standardní roztok železa (100 µg Fe/ml) připravený zředěním standardního roztoku (bod 3.7) vodou v poměru 1:9.

3.8. Standardní roztok mědi (1 000 µg Cu/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:

— v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) rozpustí 1 g práškové mědi, přidá se 5 ml peroxidu vodíku (bod 3.6) a doplní se po značku vodou.

3.8.1. Pracovní standardní roztok mědi (10 µg Cu/ml) připravený zředěním standardního roztoku (bod 3.8) vodou v poměru 1:9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1:9.

3.9. Standardní roztok manganu (1 000 µg Mn/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:

— v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) rozpustí 1 g práškového manganu a doplní se po značku vodou.

3.9.1. Pracovní standardní roztok manganu (10 µg Mn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (bod 3.9) vodou v poměru 1:9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1:9.

3.10. Standardní roztok zinku (1 000 µg Zn/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:

— v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) rozpustí 1 g páskového nebo plátkového zinku a doplní se po značku vodou.

3.10.1. Pracovní standardní roztok zinku (10 µg Zn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (bod 3.10) vodou v poměru 1:9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1:9.

3.11. Roztok chloridu lanthanitého: v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 150 ml vody a 100 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) rozpustí 12 g oxidu lanthanitého a doplní se po značku vodou.

4. **Přístroje**

4.1. Muflová pec s regulací teploty a záznamníkem (pokud možno).

4.2. Skleněné nádobí rezistentního borosilikátového typu. Doporučuje se používat přístroje, které jsou používány výlučně pro stanovení stopových prvků.

4.3. Atomový absorpční spektrofotometr splňující požadavky metody na citlivost a preciznost v požadovaném rozsahu.

5. **Postup** ([6])

5.1. *Vzorky obsahující organickou hmotu*

5.1.1. *Spalování a příprava roztoku pro analýzu* ([7])

5.1.1.1. Do křemenného nebo platinového kelímku (viz poznámka b)), předem zváženého, se naváží 5–10 g vzorku s přesností na 0,2 mg, vysuší se v sušárně při 105 °C a kelímek se potom vloží do chladné muflové pece (bod 4.1). Pec se uzavře (viz poznámka c)) a teplota se postupně zvyšuje na 450–475 °C během asi 90 minut. Tato teplota se udržuje 4 až 16 hodin (např. přes noc), aby se odstranily uhlíkaté částice. Potom se pec otevře a nechá vychladnout (viz poznámka d)).

Popel se zvlhčí vodou a přenese se do 250 ml kádinky. Kelímek se vypláchne celkem asi 5 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1) a další kyselina se přidává pomalu a opatrně do kádinky (může proběhnout prudká reakce v důsledku tvorby CO_2). Kyselina chlorovodíková (bod 3.1) se přidává po kapkách a za míchání, dokud neustane šumění. Odpaří se do sucha za občasného zamíchání skleněnou tyčinkou.

K odparku se přidá 15 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) a poté asi 120 ml vody. Promíchá se skleněnou tyčinkou, která se ponechá v kádince, a poté se kádinka zakryje hodinovým sklem. Obsah kádinky se uvede do mírného varu a udržuje se na bodu varu, dokud se popel nerozpustí. Roztok se přefiltruje přes bezpopelný filtrační papír a filtrát se jímá do 250 ml odměrné baňky. Kádinka a filtr se promyjí 5 ml horké kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) a dvakrát vroucí vodou. Odměrná baňka se doplní po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Pokud je zbytek na filtru zbarven černě (uhlík), vrátí se do pece a spaluje se dalších asi tři až pět hodin při 450–475 °C. Spalování je dokončeno, když je popel bílý nebo téměř bílý. Zbytek se rozpustí v asi 2 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.1), odpaří se do sucha a přidá se 5 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2). Roztok se zahřeje a potom se přefiltruje do odměrné baňky a doplní po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l).

Poznámky:

a) Při stanovení stopových prvků je důležité zabránit riziku kontaminace, zejména zinkem, mědí a železem. Z tohoto důvodu musí být vybavení používané při přípravě vzorků bez těchto kovů.

Ke snížení obecného rizika kontaminace se pracuje v bezprašné atmosféře s úzkostlivě čistým vybavením a pečlivě umývaným skleněným nádobím. Stanovení zinku je zvláště citlivé na mnoho typů kontaminace, např. ze skleněného nádobí, činidel, prachu atd.

b) Hmotnost vzorku, který má být spalován, se počítá z přibližného předpokládaného obsahu stopového prvku v krmivu ve vztahu k citlivosti použitého spektrofotometru. U určitých krmiv s nízkým obsahem stopových prvků může být nezbytné začít s 10–20 g vzorku a doplnit konečný roztok pouze na 100 ml.

c) Spalování se musí provádět v uzavřené peci bez vhánění vzduchu nebo kyslíku.

d) Teplota ukazovaná pyrometrem nesmí překročit 475 °C.

([6]) Lze použít i jiné metody mineralizace, pokud prokazatelně poskytují podobné výsledky (např. mikrovlnný tlakový rozklad).

([7]) Zelené pícniny (čerstvé nebo suché) často obsahují velké množství rostlinného křemíku, který může zadržovat stopové prvky, a proto musí být odstraněn. U vzorků těchto krmiv musí být proto dodržen následující modifikovaný postup. Postupuje se podle bodu 5.1.1.1 až k filtraci. Filtrační papír obsahující nerozpustný zbytek se promyje dvakrát vroucí vodou a vloží se zpět do křemenného nebo platinového kelímku.
Spaluje se v muflové peci (bod 4.1) při teplotě nižší než 550 °C, dokud všechny uhlíkaté částice zcela nezmizí. Nechá se vychladnout, přidá se několik kapek vody a poté 10–15 ml kyseliny fluorovodíkové (bod 3.4) a odpaří se do sucha při teplotě asi 150 °C. Pokud zůstane nějaký křemičitý zbytek, rozpustí se znovu v několika mililitrech kyseliny fluorovodíkové bod (bod 3.4) a odpaří se do sucha. Přidá se pět kapek kyseliny sírové (bod 3.5) a zahřívá se, dokud se nepřestane uvolňovat bílý kouř. Po přidání 5 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (bod 3.2) a asi 30 ml vody se roztok zahřeje, přefiltruje do 250 ml odměrné baňky a doplní se po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l). Pak se pokračuje ve stanovení podle bodu 5.1.2.

5.1.2. Spektrofotometrické stanovení

5.1.2.1. Příprava kalibračních roztoků

Pro každý stanovovaný prvek se připraví z pracovních standardních roztoků (bod 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 a 3.10.1) řada kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky mají koncentraci HCl asi 0,5 mol/l a (v případě železa, manganu a zinku) koncentraci chloridu lanthanitého odpovídající 0,1 % La (w/v).

Koncentrace vybraných stopových prvků musí ležet v rozsahu citlivosti použitého spektrofotometru. Níže uvedené tabulky ukazují příklad složení typických řad kalibračních roztoků; v závislosti na typu a citlivosti použitého spektrofotometru však může být nutno zvolit jiné koncentrace.

Železo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
pracovní standardní roztok (bod 3.7.1) v ml (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
HCl (bod 3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (bod 3.11) a doplní se vodou na 100 ml							

Měď

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
pracovní standardní roztok (bod 3.8.1) v ml (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
HCl (bod 3.2) v ml	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
pracovní standardní roztok (bod 3.9.1) v ml (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
HCl (bod 3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (bod 3.11) a doplní se vodou na 100 ml							

Zinek

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
pracovní standardní roztok v ml (bod 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
HCl (bod 3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (bod 3.11) a doplní se vodou na 100 ml							

5.1.2.2. Příprava roztoku pro analýzu

Při stanovení mědi lze použít přímo roztok připravený podle bodu 5.1.1. Pokud je nutné jeho koncentraci naředit na úroveň kalibračních roztoků, odpipetuje se alikvotní část roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplní se po značku kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l (bod 3.3).

Při stanovení železa, manganu a zinku se odpipetuje alikvotní část roztoku připraveného podle bodu 5.1.1 do 100 ml odměrné baňky, přidá se 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (bod 3.11) a doplní se po značku kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l (bod 3.3) (viz rovněž bod 8 „Poznámka“).

5.1.2.3. Slepá zkouška

Slepá zkouška musí zahrnovat všechny předepsané kroky postupu, ale vlastní vzorek se nepoužije. Kalibrační roztok „0“ nemůže být použit jako slepá zkouška.

5.1.2.4. Měření atomové absorpce

Atomová absorpce kalibračních roztoků a analyzovaného roztoku se změří s použitím oxidačního plamene vzduch-acetylen při těchto vlnových délkách:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Každé měření se provede čtyřikrát.

5.2. *Minerální krmiva*

Pokud vzorek neobsahuje organickou hmotu, nemusí se spalovat. Příprava se provádí podle bodu 5.1.1.1 od druhého odstavce. Nemusí se provádět ani odpařování s kyselinou fluorovodíkovou.

6. Výpočet výsledků

Koncentrace daného stopového prvku v roztoku se vypočte z kalibrační křivky a výsledek se vyjádří v miligramech stopového prvku na kilogram vzorku (ppm).

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku týmž laborantem nesmí překročit:

— 5 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahu daného stopového prvku do 50 mg/kg,

— 10 % z vyššího výsledku u obsahu daného stopového prvku od 50 do 100 mg/kg,

— 10 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahu daného stopového prvku od 100 do 200 mg/kg,

— 5 % z vyššího výsledku u obsahu daného stopového prvku nad 200 mg/kg.

8. Poznámka

Přítomnost velkého množství fosfátů může ovlivňovat stanovení železa, manganu a zinku. Aby se tomuto ovlivnění zabránilo, musí být přidáván roztok chloridu lanthanitého (bod 3.11). Pokud je váhový poměr (Ca + Mg)/P ve vzorku > 2, roztok chloridu lanthanitého (bod 3.11) se do roztoku pro analýzu ani do kalibračních roztoků přidávat nemusí.

D) STANOVENÍ OBSAHU HALOFUGINONU

DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-chinazolin-4-(3H)-on-hydrobromid

Obsah halofuginonu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC) s UV detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 8 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu halofuginonu v krmivech. Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

2. **Princip**

Obsah halofuginonu se stanoví jako volná báze po extrakci horkou vodou do ethylacetátu a následně se rozdělí jako hydrochlorid do vodného kyselého roztoku. Extrakt se přečistí na ionexové chromatografické koloně. Obsah halofuginonu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Acetonitril, pro HPLC

3.2. Pryskyřice Amberlit XAD-2

3.3. Octan amonný

3.4. Ethylacetát

3.5. Kyselina octová, ledová

3.6. Halofuginon, standardní látka (DL-*trans*-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-chinazolin-4-(3*H*)-on-hydrobromid, E 764)

3.6.1. Halofuginon, zásobní standardní roztok, 100 µg/ml

Do 500 ml odměrné baňky se naváží 50 mg halofuginonu (bod 3.6) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v tlumivém roztoku octanu amonného (bod 3.18), doplní po značku tlumivým roztokem a promíchá. Tento roztok je stálý tři týdny při teplotě 5 °C, je-li skladován ve tmě.

3.6.2. Kalibrační roztoky

Do sady 100 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/3,0/4,0 a 6,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.6.1). Doplní se po značku mobilní fází (bod 3.21) a promíchá. Roztoky mají koncentrace halofuginonu 1,0/2,0/3,0/4,0 a 6,0 µg/ml. Tyto roztoky se musí připravovat před použitím čerstvé.

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

3.8. Methanol

3.9. Dusičnan stříbrný

3.10. Askorbát sodný

3.11. Uhličitan sodný

3.12. Chlorid sodný

3.13. EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové)

3.14. Voda, pro HPLC

3.15. Uhličitan sodný, roztok, c = 10 g/100 ml

3.16. Uhličitan sodný, roztok, saturovaný chloridem sodným, c = 5 g/100 ml

50 g uhličitanu sodného (bod 3.11) se rozpustí ve vodě, doplní se na 1 litr a přidává se chlorid sodný (bod 3.12) až k nasycení roztoku.

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

10 ml HCl (bod 3.7) se zředí vodou na 1 litr.

3.18. Tlumivý roztok octanu amonného, přibližně 0,25 mol/l

19,3 g octanu amonného (bod 3.3) a 30 ml kyseliny octové (bod 3.5) se rozpustí ve vodě (bod 3.14) a doplní se na jeden litr.

3.19. Pryskyřice Amberlit XAD-2 – příprava

Přiměřené množství amberlitu (bod 3.2) se promývá ve vodě, až se odstraní všechny chloridové ionty, což se prokáže zkouškou pomocí dusičnanu stříbrného (bod 3.20) na odstraňované vodní fázi. Pak se pryskyřice promyje 50 ml methanolu (bod 3.8), který se odstraní, a pryskyřice se uloží pod čerstvý methanol.

3.20. Dusičnan stříbrný, roztok přibližně 0,1 mol/l

0,17 g dusičnanu stříbrného (bod 3.9) se rozpustí v 10 ml vody.

3.21. Mobilní fáze HPLC

Smíchá se 500 ml acetonitrilu (bod 3.1), 300 ml tlumivého roztoku octanu amonného (bod 3.18) a 1 200 ml vody (bod 3.14). pH se upraví na 4,3 kyselinou octovou (bod 3.5). Přefiltruje se 0,22µm filtrem (bod 4.8) a roztok se odplyní (např. tím, že se vystaví ultrazvuku po dobu 10 minut). Tento roztok je stálý jeden měsíc, je-li skladován ve tmě a v uzavřené nádobě.

4. **Přístroje**

4.1. Ultrazvuková lázeň

4.2. Rotační filmová odparka

4.3. Odstředivka

4.4. Zařízení pro HPLC s ultrafialovým detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou nebo s detektorem s diodovým polem

4.4.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 300 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 10 µm, nebo obdobná kolona

4.5. Skleněná kolona (300 mm × 10 mm) opatřená filtrem ze slinutého skla a uzavíracím ventilem

4.6. Filtry ze skleněných vláken, průměr 150 mm

4.7. Membránové filtry, 0,45 µm

4.8. Membránové filtry, 0,22 µm

5. **Postup**

Poznámka Halofuginon jako volná báze je nestálý v alkalických roztocích a v roztocích ethylacetátu. Nesmí zůstat v roztoku ethylacetátu déle než 30 minut.

5.1. *Obecně*

5.1.1. Provede se analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani halofuginon, ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, který byl obohacen přidáním takového množství halofuginonu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 3 mg/kg se k 10 g slepého vzorku krmiva přidá 300 µl zásobního standardního roztoku (bod 3.6.1), promíchá se a vyčká 10 minut a potom se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Poznámka: Pro účely této metody musí mít slepý vzorek krmiva podobné složení jako vzorek a při analýze nesmí být zjištěn halofuginon.

5.2. *Extrakce*

Do odstředivkové zkumavky o objemu 200 ml se naváží 10 g připraveného vzorku s přesností na 0,1 g, přidá se 0,5 g askorbátu sodného (bod 3.10), 0,5 g EDTA (bod 3.13) a 20 ml vody a promíchá se. Zkumavka se umístí na pět minut do vodní lázně (80 °C). Po vychladnutí na laboratorní teplotu se přidá 20 ml roztoku uhličitanu sodného (bod 3.15) a promíchá se. Ihned se přidá 100 ml ethylacetátu (bod 3.4) a ručně se 15 sekund intenzivně třepe. Pak se zkumavka s uvolněnou zátkou umístí na tři minuty do ultrazvukové lázně (bod 4.1). Odstředí se dvě minuty a ethylacetátová fáze se odlije přes filtr ze skleněných vláken (bod 4.6) do 500 ml dělicí nálevky. Extrakce vzorku se opakuje s dalšími 100 ml ethylacetátu. Kombinované extrakty se promývají jednu minutu 50 ml roztoku uhličitanu sodného saturovaného chloridem sodným (bod 3.16) a poté se vodná vrstva odstraní.

Organická vrstva se extrahuje po dobu jedné minuty 50 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.17). Spodní kyselinová vrstva se vypustí do 250 ml dělicí nálevky. Organická vrstva se znovu extrahuje po dobu 1,5 minuty dalšími 50 ml kyseliny chlorovodíkové a kyselinová vrstva se spojí s prvním extraktem. Spojené kyselinové extrakty se třepou přibližně 10 sekund s 10 ml ethylacetátu (bod 3.4).

Vodná vrstva se kvantitativně převede do 250 ml baňky s kulatým dnem a organická fáze se odstraní. Pomocí rotační filmové odparky (bod 4.2) se z kyselého roztoku odpaří všechen zbývající ethylacetát. Teplota vodní lázně nesmí přesáhnout 40 °C. Ve vakuu přibližně 25 mbar se všechen zbývající ethylacetát odstraní během pěti minut při teplotě 38 °C.

5.3. *Přečištění*

5.3.1. Příprava amberlitové kolony

Pro každý extrakt vzorku se připraví kolona s XAD-2. Do skleněné kolony (bod 4.5) se přenese 10 g připraveného amberlitu (bod 3.19) spolu s methanolem (bod 3.8). Na horní konec pryskyřicové kolony se vloží malá zátka ze skelné vaty. Methanol z kolony se odstraní a kolona se promyje 100 ml vody. Přívod vody se zastaví, jakmile kapalina dosáhne horního konce pryskyřicové kolony. Před použitím se kolona nechá 10 minut ekvilibrovat. Kolona nesmí nikdy vyschnout.

5.3.2. Přečištění vzorku

Extrakt (bod 5.2) se kvantitativně převede na horní část připravené amberlitové kolony (bod 5.3.1) a eluuje se, přičemž se eluát odstraňuje. Rychlost eluce nesmí přesáhnout 20 ml/min. Baňka s kulatým dnem se vypláchne 20 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.17) a tato kapalina se použije k promytí pryskyřicové kolony. Zbytek kyselého roztoku se z kolony odstraní proudem vzduchu. Promývací roztok se také odstraní. Na kolonu se přidá 100 ml methanolu (bod 3.8) a vypustí se asi 5–10 ml eluátu do 250 ml baňky s kulatým dnem. Zbývající methanol se nechá 10 minut ustát na koloně a potom se pokračuje v eluci rychlostí, která nepřesáhne 20 ml/min. Eluát se vypustí do téže baňky s kulatým dnem. Methanol se odpaří na rotační filmové odparce (bod 4.2), teplota vodní lázně nesmí přesáhnout 40 °C. Odparek se pomocí mobilní fáze (bod 3.21) kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky. Doplní se mobilní fází po značku a promíchá. Alikvotní část se filtruje membránovým filtrem (bod 4.7). Tento roztok se uschová pro stanovení HPLC (bod 5.4).

5.4. *Stanovení HPLC*

5.4.1. Parametry

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.4.1)

HPLC mobilní fáze (bod 3.21)

Průtok: 1,5 až 2 ml/min.

Detekční vlnová délka: 243 nm

Objem nástřiku: 40 až 100 µl.

Stálost chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.6.2), který obsahuje 3,0 µg/ml halofuginonu, dokud se nedosáhne konstantních výšek (nebo ploch) píků a konstantních retenčních časů.

5.4.2. Kalibrační křivka

Provede se opakovaný nástřik každého kalibračního roztoku (bod 3.6.2) a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vynesením průměrných hodnot výšek nebo ploch píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v µg/ml.

5.4.3. Roztok vzorku

Provede se opakovaný nástřik roztoku vzorku (bod 5.3.2) při použití stejného objemu jako u kalibračních roztoků a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píků halofuginonu.

6. Výpočet výsledků

Koncentrace halofuginonu v roztoku vzorku v µg/ml se stanoví podle průměrné hodnoty výšky (plochy) halofuginonových píků v roztoku vzorku porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.4.2).

Obsah halofuginonu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

kde:

c: koncentrace halofuginonu v roztoku vzorku v µg/ml,

m: hmotnost navážky vzorku v g.

7. Ověření výsledků

7.1. *Identita*

Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (bod 3.6.2) obsahujícího 6,0 µg/ml.

7.1.1. Simultánní chromatografie

Extrakt vzorku se obohatí přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.6.2). Množství přidaného halofuginonu musí odpovídat odhadovanému obsahu halofuginonu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku halofuginonu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se smí odchylovat od šířky původního píku nejvýše o ± 10 %.

7.1.2. Detektor s diodovým polem

Výsledky jsou posuzovány podle těchto kritérií:

a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává ± 2 nm;

b) při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí záznam spektra ve vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže v žádném sledovaném bodě odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu;

c) při vlnové délce mezi 225 a 300 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit 0,5 mg/kg při obsahu halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. *Výtěžnost*

Výtěžnost u obohaceného slepého vzorku musí činit nejméně 80 %.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

Byla provedena kolaborativní studie ([8]), během níž byly zkoušeny tři vzorky osmi laboratořemi.

Výsledky

	Vzorek A (slepý) při převzetí	Vzorek B (moučka)		Vzorek C (pelety)	
		při převzetí	po dvou měsících	při převzetí	po dvou měsících
průměr [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
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = nezjištěno

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti (%)

Rec. = výtěžnost (%)

E) STANOVENÍ OBSAHU ROBENIDINU

1,3-bis[(4-chlorbenzyliden)amino]guanidin-hydrochlorid

Obsah robenidinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC) s UV detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 8 níže.

([8]) The Analyst 108, 1983, s. 1252 až 1256.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu robenidinu v krmivech. Mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje okyseleným methanolem. Extrakt se vysuší a jeho alikvotní část se přečistí na koloně s oxidem hlinitým. Robenidin se eluuje z kolony methanolem, koncentruje se a na vhodný objem se upraví pomocí mobilní fáze. Obsah robenidinu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Methanol

3.2. Okyselený methanol

Do 500 ml odměrné baňky se odměří 4,0 ml kyseliny chlorovodíkové ($\rho 20$ = 1,18 g/ml), doplní se po značku methanolem (bod 3.1) a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.3. Acetonitril, pro HPLC

3.4. Molekulární síto

Typ 3 A, 8–12 mesh (1,6–2,5 mm perličky krystalického hlinitokřemičitanu, průměr pórů 0,3 mm).

3.5. Oxid hlinitý, kyselý, stupeň aktivity I pro kolonovou chromatografii

100 g oxidu hlinitého se naváží do vhodné nádoby a přidají se 2,0 ml vody. Zazátkuje se a protřepává přibližně 20 minut. Skladuje se v dobře zazátkované nádobě.

3.6. Dihydrogenfosforečnan draselný, roztok c = 0,025 mol/l

3,40 g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí ve vodě (pro HPLC) v 1 000 ml odměrné baňce, doplní se po značku a promíchá.

3.7. Hydrogenfosforečnan sodný, roztok, c = 0,025 mol/l

3,55 g bezvodého (nebo 4,45 g dihydrátu, nebo 8,95 g dodekahydrátu) hydrogenfosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (pro HPLC) v 1 000 ml odměrné baňce, doplní se po značku a promíchá.

3.8. Mobilní fáze HPLC

Smíchá se:

650 ml acetonitrilu (bod 3.3),

250 ml vody (pro HPLC),

50 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (bod 3.6),

50 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (bod 3.7).

Přefiltruje se 0,22µm filtrem (bod 4.6) a roztok se odplyní (např. ultrazvukem po dobu 10 minut).

3.9. Standardní látka

Čistý robenidin: 1,3-bis[(4-chlorbenzyliden)amino]guanidin-hydrochlorid.

3.9.1. Zásobní standardní roztok robenidinu: 300 µg/ml

Naváží se 30 mg standardní látky robenidinu (bod 3.9) s přesností na 0,1 mg. Rozpustí se v okyseleném methanolu (bod 3.2) ve 100 ml odměrné baňce, doplní se po značku týmž rozpouštědlem a promíchá se. Baňka se obalí aluminiovou fólií a uloží ve tmě.

3.9.2. Robenidin, pracovní standardní roztok: 12 µg/ml

Odměří se 10,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.9.1) do 250 ml odměrné baňky, doplní se po značku mobilní fází (bod 3.8) a promíchá. Baňka se obalí aluminiovou fólií a uloží ve tmě.

3.9.3. Kalibrační roztoky

Do sady 50 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 5,0/10,0/15,0/20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku (bod 3.9.2). Doplní se po značku mobilní fází (bod 3.8) a promíchá. Tyto roztoky odpovídají 1,2/2,4/3,6/4,8 a 6,0 µg/ml robenidinu. Tyto roztoky se musí připravovat před použitím čerstvé.

3.10. Voda, pro HPLC

4. **Přístroje**

4.1. Skleněná kolona

Vyrobená z tmavého skla, opatřená uzavíracím ventilem a nádržkou o obsahu přibližně 150 ml. Vnitřní průměr 10–15 mm, délka 250 mm.

4.2. Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka

4.3. Rotační filmová odparka

4.4. Zařízení pro HPLC vybavené ultrafialovým detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektorem s diodovým polem pracujícím v pásmu 250–400 nm

4.4.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii: 300 mm × 4 mm, C_{18}, náplň 10 µm, nebo obdobná

4.5. Filtrační papír ze skleněných vláken (Whatman GF/A nebo podobný)

4.6. Membránové filtry, 0,22 µm.

4.7. Membránové filtry, 0,45 µm.

5. **Postup**

Poznámka: Robenidin je citlivý na světlo. Proto se při všech úkonech používá vždy nádobí z tmavého skla.

5.1. *Obecně*

5.1.1. Provede se analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani robenidin, ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva (bod 5.1.1), který byl obohacen přidáním takového množství robenidinu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 60 mg/kg se převedou 3,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.9.1) do 250 ml kónické baňky. Roztok se odpaří asi na objem 0,5 ml v proudu dusíku. Přidá se 15 g slepého vzorku krmiva, promíchá se a vyčká 10 minut a potom se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Poznámka: Pro účely této metody musí mít slepý vzorek krmiva podobné složení jako vzorek a při analýze nesmí být zjištěn robenidin.

5.2. *Extrakce*

Do 250 ml kónické baňky se naváží přibližně 15 g připraveného vzorku s přesností na 0,01 g, přidá se 100,0 ml okyseleného methanolu (bod 3.2), zazátkuje a hodinu třepe na třepačce (bod 4.2). Roztok se přefiltruje přes filtrační papír ze skleněných vláken (bod 4.5) a celý objem filtrátu se jímá do 150 ml kónické baňky. Přidá se 7,5 g molekulárního síta (bod 3.4), zazátkuje a pět minut se třepe. Potom se ihned přefiltruje přes filtrační papír ze skleněných vláken. Tento roztok se použije k čištění (bod 5.3).

5.3. *Čištění*

5.3.1. Příprava kolony s oxidem hlinitým

Do spodního konce skleněné kolony (bod 4.1) se vloží malá zátka ze skelné vaty a utěsní se skleněnou tyčinkou. Naváží se 11,0 g připraveného oxidu hlinitého (bod 3.5) a nasype se do kolony, pokud možno s minimální časovou prodlevou v okolním prostředí. Oxid hlinitý se v naplněné koloně setřese lehkým poklepem na spodní konec kolony.

5.3.2. Čištění vzorku

Na kolonu se napipetuje 5,0 ml připraveného extraktu vzorku (bod 5.2). Špička pipety se opře o stěnu kolony a roztok se nechá absorbovat oxidem hlinitým. Robenidin se z kolony eluuje pomocí 100 ml methanolu (bod 3.1) při rychlosti průtoku 2–3 ml za minutu a eluát se jímá do 250 ml baňky s kulatým dnem. Roztok methanolu se za redukovaného tlaku a při teplotě 40 °C odpaří do sucha v rotační filmové odparce (bod 4.3). Odparek se znovu rozpustí ve 3–4 ml mobilní fáze (bod 3.8) a kvantitativně se převede do 10 ml odměrné baňky. Baňka se několikrát vypláchne 1–2 ml mobilní fáze a tyto roztoky se přidají do odměrné baňky. Baňka se doplní po značku týmž rozpouštědlem a promíchá. Alikvotní část se přefiltruje přes 0,45µm membránový filtr (bod 4.7). Tento roztok se použije pro stanovení HPLC (bod 5.4).

5.4. *Stanovení HPLC*

5.4.1. Parametry

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky:

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.4.1)

Mobilní fáze HPLC (bod 3.8)

Průtok: 1,5 až 2 ml/min

Vlnová délka detektoru: 317 nm

Objem nástřiku: 20 až 50 µl.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.9.3), který obsahuje 3,6 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.4.2. Kalibrační křivka

Provede se opakovaný nástřik každého kalibračního roztoku (bod 3.9.3) a změří se výšky (plochy) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vynesením průměrných hodnot výšek nebo ploch píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v µg/ml.

5.4.3. Roztok vzorku

Provede se opakovaný nástřik extraktu vzorku (bod 5.3.2) při použití stejného objemu jako u kalibračních roztoků a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píků robenidinu.

6. **Výpočet výsledků**

Z průměrných hodnot výšky (plochy) robenidinových píků v roztoku vzorku se určí koncentrace robenidinu v roztoku vzorku v µg/ml porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.4.2).

Obsah robenidinu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

kde:

c = koncentrace robenidinu v roztoku vzorku v µg/ml,

m = hmotnost navážky vzorku v g.

7. **Ověření výsledků**

7.1. *Identita*

Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku a kalibračního roztoku (bod 3.9.3) obsahujícího 6 µg/ml.

7.1.1. Simultánní chromatografie

Extrakt vzorku je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.9.3). Množství přidaného robenidinu musí odpovídat odhadovanému obsahu robenidinu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku robenidinu, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině maximální výšky se smí odchylovat od šířky původního píku nejvýše o ± 10 %.

7.1.2. Detektor s diodovým polem

Výsledky jsou posuzovány podle těchto kritérií:

a) při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává obvykle ± 2 nm;

b) při vlnové délce mezi 250 a 400 nm se nesmí záznam spektra ve vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže v žádném sledovaném bodě odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu;

c) při vlnové délce mezi 250 a 400 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí přesáhnout 10 % z vyššího výsledku u obsahu robenidinu nad 15 mg/kg.

7.3. *Výtěžnost*

Výtěžnost u obohaceného slepého vzorku musí činit nejméně 85 %.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

V EU byla provedena kolaborativní studie, během níž dvanáct laboratoří analyzovalo čtyři vzorky krmiv pro drůbež a králíky ve formě moučky nebo v peletované formě. U každého vzorku byla provedena opakovaná analýza. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Drůbež		Králíci	
	Moučka	Pelety	Moučka	Pelety
průměr [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
Výtěžnost [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardní odchylka opakovatelnosti

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti v %

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti v %

F) STANOVENÍ OBSAHU DIKLAZURILU

2,6-dichlor-alfa-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro–3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3H)yl)benzenacetonitril

Obsah diklazurilu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC) s ternárním gradientem a UV detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu diklazurilu v krmných směsích a premixech ([9]). Mez detekce je 0,1 mg/kg, mez stanovitelnosti 0,5 mg/kg. Nižší meze stanovitelnosti jsou dosažitelné, ale uživatel je musí validovat.

2. **Princip**

Po přidání vnitřního standardu se vzorek extrahuje okyseleným methanolem. U krmiv se alikvotní část extraktu přečistí na SPE patroně C18. Diklazuril se z patrony eluuje směsí okyseleného methanolu a vody. Po odpaření se zbytek rozpustí v roztoku DMF/voda. U premixů se extrakt odpaří a zbytek se rozpustí v roztoku DMF/voda. Obsah diklazurilu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s ternárním gradientem a UV detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Voda, pro HPLC

3.2. Octan amonný

3.3. Tetrabutylamonium-hydrogensíran (TBHS)

3.4. Acetonitril, pro HPLC

3.5. Methanol, pro HPLC

3.6. *N,N*-dimethylformamid (DMF)

3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8. Standardní látka: diklazuril:
2,6-dichlor-alfa-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro– 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3*H*)yl)benzenacetonitril
s deklarovanou čistotou

([9]) Tuto metoda lze použít i pro stanovení diklazurilu v krmných surovinách.

3.8.1. Zásobní standardní roztok diklazurilu, 500 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg diklazurilu (bod 3.8) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc ([10]).

3.8.2. Standardní roztok diklazurilu, 50 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.8.1), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9. Vnitřní standard:
2,6-dichlor-α-(4-chlorfenyl)-4-(4,5-dihydro– 3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3*H*)-yl)-α-methylbenzenacetonitril (methyldiklazuril)

3.9.1. Zásobní roztok vnitřního standardu, 500 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg vnitřního standardu (bod 3.9) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.2. Roztok vnitřního standardu, 50 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se převede 5,00 ml zásobního roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.1), doplní se DMF (bod 3.6) po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.9.3. Roztok vnitřního standardu pro premixy, p/1 000 mg/ml (p = nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg)

Do 100 ml odměrné baňky se naváží p/10 mg vnitřního standardu s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (bod 3.6) v ultrazvukové lázni (bod 4.7), doplní DMF po značku a promíchá. Odměrná baňka se obalí hliníkovou fólií nebo se použije odměrná baňka z tmavého skla a uchovává se v chladničce. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.10. Kalibrační roztoky

3.10.1. Kalibrační roztok, 1 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 1,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 17 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.2. Kalibrační roztok, 2 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 2,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 16 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.3. Kalibrační roztok, 3 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 3,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 15 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

([10]) Delší stabilita (až 1 rok) je možná, ale musí ji potvrdit konkrétní laboratoř.

3.10.4. Kalibrační roztok, 4 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetují 4,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 14 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.5. Kalibrační roztok, 5 µg/ml (diklazuril)

Do 50 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,00 ml standardního roztoku diklazurilu (bod 3.8.2) a 2,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2). Přidá se 13 ml DMF (bod 3.6), doplní se vodou (bod 3.1) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

Poznámka: kalibrační roztoky (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) pokrývají koncentraci diklazurilu v krmivu v rozmezí od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg při použití stávajícího protokolu.

3.11. SPE patrona C_{18}, např. Mega Bond Elut, velikost: 20 ml, sorpční hmotnost: 5 000 mg (stabilizace podle pokynů dodavatele).

3.12. Extrakční rozpouštědlo: okyselený methanol.

Do 1 000 ml methanolu (bod 3.5) se napipetuje 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.7) a promíchá.

3.13. Mobilní fáze pro HPLC

3.13.1. Eluent A: roztok octanu amonného a tetrabutylamonium-hydrogensíranu.

5 g octanu amonného (bod 3.2) a 3,4 g TBHS (bod 3.3) se rozpustí v 1 000 ml vody (bod 3.1) a promíchá se.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (bod 3.4).

3.13.3. Eluent C: methanol (bod 3.5).

4. **Přístroje**

4.1. Mechanická třepačka

4.2. Zařízení pro HPLC s ternárním gradientem:

4.2.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, Hypersil ODS, náplň 3 µm, 100 mm × 4,6 mm, nebo obdobná

4.2.2. UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor s diodovým polem

4.3. Rotační filmová odparka

4.4. Membránový filtr (např. chemicky odolný Nylon), 0,45 µm

4.5. Jednorázová injekční stříkačka, 5 ml

4.6. Vakuové zařízení

4.7. Ultrazvuková lázeň

5. **Postup**

5.1. *Obecně*

5.1.1. Slepý vzorek krmiva

Provede se analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani diklazuril, ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva musí mít podobné složení jako vzorek a při analýze nesmí být zjištěn diklazuril ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Zkouška na výtěžnost

Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, který byl obohacen přidáním takového množství diklazurilu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 1 mg/kg se k 50 g slepého vzorku krmiva přidá 0,1 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.8.1). Důkladně se promíchá a vyčká 10 minut, znovu se několikrát promíchá a potom se se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek krmiva podobného složení jako vzorek (viz bod 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídavku. V tom případě se vzorek, jenž má být analyzován, obohatí přidáním takového množství diklazurilu, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Obohacený vzorek se potom zkouší společně se vzorkem neobohaceným a výtěžnost se vypočte odečtením.

5.2. *Extrakce*

5.2.1. Krmné směsi

Do 500 ml kónické baňky se naváží přibližně 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přidá se 1,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.2) a 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a baňka se zazátkuje. Směs se přes noc třepe na třepačce (bod 4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 20 ml supernatantu se převede do vhodné skleněné nádoby a zředí se 20 ml vody (bod 3.1). Tento roztok se nanese na extrakční patronu (bod 3.11) a prosaje se pomocí vakua (bod 4.6). Patrona se promyje 25 ml směsi složené z extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a vody (bod 3.1), 65 + 35 (V + V). Spojené frakce se odstraní a složky se eluují 25 ml směsi složené z extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a vody, 80 + 20 (V + V). Tato frakce se v rotační odparce (bod 4.3) odpaří při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 1,0 ml DMF (bod 3.6), přidá se 1,5 ml vody (bod 3.1) a promíchá. Přefiltruje se přes membránový filtr (bod 4.4), který je připevněn k jednorázové injekční stříkačce (bod 4.5). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.2.2. Premixy

Do 500 ml kónické baňky se naváží přibližně 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 1,00 ml roztoku vnitřního standardu (bod 3.9.3) a 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.12) a baňka se zazátkuje. Směs se přes noc třepe na třepačce (bod 4.1). Poté se nechá 10 minut usadit. 10 000/p ml (p = nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg) supernatantu se převede do baňky s kulatým dnem vhodné velikosti. V rotační odparce (bod 4.3) se odpaří za sníženého tlaku při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 10,0 ml DMF (bod 3.6), přidá se 15,0 ml vody (bod 3.1) a promíchá. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.3. *Stanovení HPLC*

5.3.1. Parametry

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné nebo lepší výsledky.

— Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, náplň 3 µm, nebo obdobná.

— Mobilní fáze

  — Eluent A (bod 3.13.1): vodný roztok octanu amonného a tetrabutylamonium-hydrogensíranu.

  — Eluent B (bod 3.13.2): acetonitril.

  — Eluent C (bod 3.13.3): methanol.

— Druh eluce – lineární gradientová eluce

  — výchozí podmínky: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V),

  — po 10 minutách gradientová eluce po dobu 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V),

  — 10 minut proplachovat eluentem B.

— Průtok: 1,5–2 ml/min.

— Objem nástřiku: 20 µl.

— Vlnová délka detektoru: 280 nm.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.10.2), který obsahuje 2 µg/ml diklazurilu, a vnitřního standardu, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2. Chromatografická analýza kalibračních roztoků

Dvakrát se nastříkne 20 µl kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5), stanoví se a integrují píky diklazurilu a vnitřního standardu a sestrojí se kalibrační křivka na základě poměru průměrné hodnoty výšky (plochy) píku diklazurilu k průměrné hodnotě výšky (plochy) píku vnitřního standardu vůči koncentraci diklazurilu v kalibračních roztocích (µg/ml).

5.3.3. Chromatografická analýza roztoků vzorku

Dvakrát se nastříkne 20 µl roztoku vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) a stanoví se průměrná hodnota výšky (plochy) píku diklazurilu a vnitřního standardu.

6. Výpočet výsledků

6.1. *Krmné směsi*

Obsah diklazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{\frac{Výška(d,s)}{Výška(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ nebo } w = \frac{\frac{Plocha(d,s)}{Plocha(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

kde:

— Výška(d,s) je výška píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)

— Plocha(d,s) je plocha píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)

— Výška(i,s) je výška píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)

— Plocha(i,s) je plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.1)

— b je průsečík kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2

— a je sklon kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2

— m je hmotnost navážky vzorku v g

— V je konečný objem extraktu vzorku po opětovném rozpuštění podle bodu 5.2.1 v ml (tj. 2,5 ml)

6.2. *Premixy*

Obsah diklazurilu (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{\frac{Výška(d,s)}{Výška(i,s)} - b}{a} \times \frac{0{,}02V}{m} \times \text{p nebo } w = \frac{\frac{Plocha(d,s)}{Plocha(i,s)} - b}{a} \times \frac{0{,}02V}{m} \times \text{p}$$

kde:

— Výška(d,s) je výška píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)

— Plocha(d,s) je plocha píku diklazurilu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)

— Výška(i,s) je výška píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)

— Plocha(i,s) je plocha píku vnitřního standardu v roztoku vzorku (bod 5.2.2)

— b je průsečík kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2

— a je sklon kalibrační křivky vynesené z kalibračních roztoků (bod 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 a 3.10.5) podle bodu 5.3.2

— m je hmotnost navážky vzorku v g

— V je konečný objem extraktu vzorku po opětovném rozpuštění podle bodu 5.2.2 v ml (tj. 25 ml)

— p je nominální obsah diklazurilu v premixu v mg/kg

7. **Ověření výsledků**

7.1. *Identita*

Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) a kalibračního roztoku (bod 3.10.2).

7.1.1. Simultánní chromatografie

Extrakt vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.10.2). Přidané množství diklazurilu musí odpovídat obsahu diklazurilu v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku diklazurilu a píku vnitřního standardu, a to úměrně přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině výšky se smí odchylovat od šířky původního píku diklazurilu nebo píku interního standardu v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o ± 10 %.

7.1.2. Detektor s diodovým polem

Výsledky jsou posuzovány podle těchto kritérií:

a) Při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává obvykle ± 2 nm.

b) Při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí záznam spektra ve vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže v žádném sledovaném bodě odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu.

c) Při vlnové délce mezi 230 a 320 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou nezávislých měření provedených u dvou podvzorků nesmí překročit:

— 30 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu diklazurilu mezi 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg u obsahu diklazurilu mezi 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,

— 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu diklazurilu nad 5 mg/kg.

7.3. *Výtěžnost*

Výtěžnost u obohaceného (slepého) vzorku musí činit nejméně 80 %.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

Byly provedeny dvě kolaborativní studie. V první studii provedené jinou skupinou laboratoří v roce 1994 byly analyzovanými vzorky dva premixy (O 100, A 100) a tři vzorky doplňkového krmiva pro drůbež (L1, Z1, K1). Jeden vzorek premixu byl smísen s organickou matricí (O 100) a druhý s anorganickou matricí (A 100). Teoretický obsah diklazurilu je 100 mg/kg. Laboratoře byly pověřeny, aby každý ze vzorků podrobily jedné nebo dvěma analýzám. (Podrobnější údaje o první kolaborativní studii viz Journal of AOAC International, svazek 77, č. 6, 1994, s. 1359–1361).

Ve druhé kolaborativní studii byly analyzovány tři krmné směsi pro drůbež obsahující diklazuril v koncentracích 0,9 mg/kg (MAT 1) a 1,5 mg/kg (MAT 2) a slepý vzorek krmiva (MAT 3). Podrobné údaje o druhé studii viz Technická zpráva Společného výzkumného střediska (2016) a Journal of AOAC International, svazek 102, č. 2, 2019, s. 646–652. Výsledky obou kolaborativních studií jsou uvedeny v následující tabulce.

	Vzorek 1 A 100	Vzorek 2O 100	Vzorek 3 L1	Vzorek 4 Z1	Vzorek 5 K1	Vzorek 6 MAT 1	Vzorek 7 MAT 2	Vzorek 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Průměr (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	–
Nominální obsah (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	–
Odkaz (*)	První studie z roku 1 994	První studie z roku 1 994	První studie z roku 1 994	První studie z roku 1 994	První studie z roku 1 994	Druhá studie z roku 2 015	Druhá studie z roku 2 015	Druhá studie z roku 2 015

L= počet laboratoří

n= počet jednotlivých hodnot

S_r = standardní odchylka opakovatelnosti

CV_r = variační koeficient opakovatelnosti

S_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti

LOQ= mez stanovitelnosti

(*) První studie z roku 1994: Journal of AOAC International, svazek 77, č. 6, 1994, s. 1359–1361; druhá studie z roku 2015: Technická zpráva Společného výzkumného střediska „*Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study*“ (2016).

9. **Obecné poznámky**

Musí být předem prokázáno, že odezva diklazurilu je měřena v lineární oblasti koncentrace.

Alespoň pro analýzu diklazurilu v krmných směsích s vysokým obsahem tuku (pro tento účel vyšším než 12 % tuku) lze tuto metodu analýzy nahradit jinými metodami založenými na HPLC, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), pokud má tato alternativní metoda rovnocenné charakteristiky účinnosti (výtěžnost, preciznost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti).

G) STANOVENÍ OBSAHU LASALOCIDU SODNÉHO

Sodná sůl polyetherové karboxylové kyseliny produkované Streptomyces lasaliensis.

Obsah lasalocidu sodného se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC) s použitím spektrofluorimetrického (fluorescenčního) detektoru, jak je popsáno v bodech 1 až 8 níže.

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu lasalocidu sodného v krmivech. Mez detekce je 5 mg/kg, mez stanovitelnosti 10 mg/kg.

2. **Princip**

Lasalocid sodný se extrahuje ze vzorku okyseleným methanolem a stanoví se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s použitím spektrofluorimetrického (fluorescenčního) detektoru.

3. **Činidla**

3.1. Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.2. Kyselina fosforečná, w (w/w) = 85 %

3.3. Roztok kyseliny fosforečné, c = 20 %

23,5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.2) se doplní vodou na 100 ml.

3.4. 6-methyl-2-heptylamin (1,5-dimethylhexylamin), w (w/w) = 99 %

3.5. Methanol, pro HPLC

3.6. Kyselina chlorovodíková, hustota = 1,19 g/ml

3.7. Fosfátový tlumivý roztok, c = 0,01 mol/l

V 500 ml vody (bod 3.11) se rozpustí 1,36 g KH_2PO_4 (bod 3.1), přidá se 3,5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.2) a 10,0 ml 6-methyl-2-heptylaminu (bod 3.4). pH se upraví na 4,0 roztokem kyseliny fosforečné (bod 3.3) a doplní se vodou (bod 3.11) na 1 000 ml.

3.8. Okyselený methanol

Do 1 000 ml odměrné baňky se odměří 5,0 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.6), doplní se methanolem (bod 3.5) po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.9. HPLC mobilní fáze, roztok fosfátového tlumivého roztoku a methanolu 5 + 95 (V + V)

Smíchá se 5 ml fosfátového tlumivého roztoku (bod 3.7) a 95 ml methanolu (bod 3.5).

3.10. Standardní látka lasalocid sodný s deklarovanou čistotou, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sodná sůl polyetherové karboxylové kyseliny produkovaná *Streptomyces lasaliensis*), E 763

3.10.1. Zásobní standardní roztok lasalocidu sodného, 500 µg/ml

Do 100 ml odměrné baňky se naváží 50 mg lasalocidu sodného (bod 3.10) s přesností na 0,1 mg a rozpustí se v okyseleném methanolu (bod 3.8), doplní se jím po značku a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.2. Pracovní standardní roztok lasalocidu sodného, 50 µg/ml

Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 10,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.10.1), doplní se po značku okyseleným methanolem (bod 3.8) a promíchá. Tento roztok se musí připravovat před použitím čerstvý.

3.10.3. Kalibrační roztoky

Do sady 50 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/4,0/5,0 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku (bod 3.10.2). Doplní se po značku okyseleným methanolem (bod 3.8) a promíchá. Tyto roztoky odpovídají 1,0/2,0/4,0/5,0 a 10,0 µg lasalocidu sodného na ml. Tyto roztoky se musí připravovat před použitím čerstvé.

3.11. Voda, pro HPLC

4. **Přístroje**

4.1. Ultrazvuková lázeň (nebo vodní třepací lázeň) s kontrolou teploty

4.2. Membránové filtry, 0,45 µm

4.3. Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem pro injektované objemy 20 µl

4.3.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm × 4 mm, reverzní fáze C_{18}, náplň 5 µm, nebo obdobná

4.3.2. Spektrofluorimetr s nastavitelnou excitační i emisní vlnovou délkou

5. **Postup**

5.1. *Obecně*

5.1.1. Slepý vzorek krmiva

Pro provedení zkoušky na výtěžnost (bod 5.1.2) se provede analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani lasalocid sodný, ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva musí mít podobné složení jako vzorek a nesmí být zjištěn lasalocid sodný ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Zkouška na výtěžnost

Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, který byl obohacen přidáním takového množství lasalocidu sodného, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 100 mg/kg se převede 10,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.10.1) do 250 ml kónické baňky a roztok se odpaří na objem přibližně 0,5 ml. Přidá se 50 g slepého vzorku krmiva. Důkladně se promíchá a vyčká 10 minut, znovu se několikrát promíchá a potom se se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek krmiva podobného složení jako vzorek (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídavku. V tom případě se vzorek, jenž má být analyzován, obohatí přidáním takového množství lasalocidu sodného, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Tento vzorek se potom zkouší společně se vzorkem neobohaceným a výtěžnost se vypočte odečtením.

5.2. *Extrakce*

5.2.1. Krmiva

Do 250 ml kónické baňky se zátkou se naváží 5–10 g vzorku s přesností na 0,01 g. Pipetou se přidá 100,0 ml okyseleného methanolu (bod 3.8). Baňka se volně uzavře zátkou a promíchá kroužením. Potom se vloží na 20 minut do ultrazvukové lázně (bod 4.1) při teplotě přibližně 40 °C. Pak se baňka vyjme a ochladí na laboratorní teplotu. Nechá se stát asi jednu hodinu, aby se usadily suspendované částice, a potom se alikvotní část přefiltruje přes 0,45µm membránový filtr (4.2) do vhodné nádoby. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.2.2. Premixy

Do 250 ml odměrné baňky se naváží asi 2 g nemletého vzorku premixu s přesností na 0,001 g. Přidá se 100,0 ml okyseleného methanolu (bod 3.8) a promíchá kroužením. Potom se vloží na 20 minut do ultrazvukové lázně (bod 4.1) při teplotě přibližně 40 °C. Pak se baňka vyjme a ochladí na laboratorní teplotu. Doplní se po značku okyseleným methanolem (bod 3.8) a důkladně promíchá. Nechá se stát asi jednu hodinu, aby se usadily suspendované částice, a potom se alikvotní část přefiltruje přes 0,45µm membránový filtr (bod 4.2). Vhodný objem čirého filtrátu se naředí okyseleným methanolem (bod 3.8) na konečnou koncentraci asi 4 µg/ml lasalocidu sodného. Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.3. *Stanovení HPLC*

5.3.1. Parametry

Následující podmínky jsou doporučené; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky:

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.3.1):	125 mm × 4 mm, reverzní faze C_{18}, náplň 5 µm, nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.9):	směs fosfátového tlumivého roztoku (bod 3.7) a methanolu (bod 3.5), 5 + 95 (V+V)
Průtok:	1,2 ml/min
Detekční vlnová délka:	excitace: 310 nm
	emise: 419 nm
Objem nástřiku:	20 µl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.10.3), který obsahuje 4,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek (nebo ploch) píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2. Kalibrační křivka

Provede se opakovaný nástřik každého kalibračního roztoku (bod 3.10.3) a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vynesením průměrných hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v µg/ml.

5.3.3. Roztok vzorku

Provede se opakovaný nástřik extraktů vzorků získaných podle bodů 5.2.1 nebo 5.2.2 při použití stejného objemu jako u kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků lasalocidu sodného.

6. **Výpočet výsledků**

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píku získané nástřikem roztoku vzorku (bod 5.3.3) se porovnáním s kalibrační křivkou stanoví koncentrace lasalocidu sodného v µg/ml.

6.1. *Krmiva*

Obsah lasalocidu sodného (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

c = koncentrace lasalocidu sodného v roztoku vzorku (bod 5.2.1) v µg/ml

V_1 = objem extraktu vzorku podle bodu 5.2.1 v ml (tj. 100 ml)

m = hmotnost navážky vzorku v g

6.2. *Premixy*

Obsah lasalocidu sodného (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

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

kde:

c = koncentrace lasalocidu sodného v roztoku vzorku (bod 5.2.2) v µg/ml

V_2 = objem extraktu vzorku podle bodu 5.2.2 v ml (tj. 250 ml)

f = faktor ředění podle bodu 5.2.2

m = hmotnost navážky vzorku v g

7. **Ověření výsledků**

7.1. *Identita*

Metody založené na spektrofluorimetrické detekci jsou méně náchylné na interference než metody s UV detekcí. Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií.

7.1.1. Simultánní chromatografie

Extrakt vzorku (bod 5.2.1 nebo 5.2.2) je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.10.3). Přidané množství lasalocidu sodného musí odpovídat obsahu lasalocidu sodného v extraktu vzorku. Přídavek se projeví pouze zvýšením píku lasalocidu sodného, a to úměrně k přidanému množství lasalocidu sodného a ředění extraktu. Šířka píku v polovině výšky se smí odchylovat od šířky původního píku v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o ± 10 %.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit:

— 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu lasalocidu sodného od 30 mg/kg do 100 mg/kg,

— 15 mg/kg u obsahu lasalocidu sodného od 100 mg/kg do 200 mg/kg,

— 7,5 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu lasalocidu sodného nad 200 mg/kg.

7.3. *Výtěžnost*

Pro obohacený (slepý) vzorek krmiva činí výtěžnost nejméně 80 %. Pro obohacené vzorky premixů činí výtěžnost nejméně 90 %.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

Byla provedena kolaborativní studie (*), během níž dvanáct laboratoří analyzovalo dva premixy (vzorky 1 a 2) a pět krmiv (vzorky 3–7). U každého vzorku byla provedena opakovaná analýza. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Vzorek 1 Premix pro kuřata	Vzorek 2 Premix pro krůty	Vzorek 3 Pelety pro krůty	Vzorek 4 Krmná směs pro kuřata sypká	Vzorek 5 Krmivo pro krůty	Vzorek 6 Krmivo pro drůbež A	Vzorek 7 Krmivo pro drůbež B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
průměr [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
Nominální obsah [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (+)	35 (+)

L= počet laboratoří

n= počet jednotlivých výsledků

s_r= standardní odchylka opakovatelnosti

s_R= standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_r= variační koeficient opakovatelnosti v %

CV_R= variační koeficient reprodukovatelnosti v %

(*) Analyst, 1995, 120, s. 2175–2180

(**) Obsah deklarovaný výrobcem

(+) krmivo připravené v laboratoři

H) STANOVENÍ OBSAHU AMPROLIA HYDROCHLORIDU

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-methylpyridinium chlorid monohydrochlorid

1. **Účel a oblast použití**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu amprolia v krmivech. Mez detekce je 1 mg/kg, mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje směsí methanolu a vody. Po zředění mobilní fází a membránové filtraci se obsah amprolia stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s výměnou kationtů a UV detekcí.

3. **Činidla**

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, pro HPLC

3.3. Voda, pro HPLC

3.4. Roztok dihydrogenfosforečnanu sodného, c = 0,1 mol/l

13,80 g dihydrogenfosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (bod 3.3) v 1 000 ml odměrné baňce, doplní se vodou (bod 3.3) po značku a promíchá.

3.5. Roztok chloristanu sodného, c = 1,6 mol/l

224,74 g chloristanu sodného se rozpustí ve vodě (bod 3.3) v 1 000 ml odměrné baňce, doplní se vodou (bod 3.3) po značku a promíchá.

3.6. Mobilní fáze pro HPLC (viz poznámka 9.1).

Směs acetonitrilu (bod 3.2), roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (bod 3.4) a roztoku chloristanu sodného (bod 3.5), 450 + 450 + 100 (v+v+v). Roztok se před použitím přefiltruje přes 0,22µm membránový filtr (bod 4.3) a odplyní (např. v ultrazvukové lázni (bod 4.4) po dobu nejméně 15 minut).

3.7. Standardní látka: amprolium, čisté, 1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)-methyl]-2-pikoliniumchlorid-hydrochlorid, E 750 (viz bod 9.2)

3.7.1. Zásobní standardní roztok amprolia, 500 µg/ml

Do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg amprolia (bod 3.7), rozpustí se v 80 ml methanolu (bod 3.1) a vloží se na 10 minut do ultrazvukové lázně (bod 4.4). Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.7.2. Amprolium, pracovní standardní roztok, 50 µg/ml

Do 50 ml odměrné baňky se napipetuje 5,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.7.1), doplní se po značku extrakčním rozpouštědlem (bod 3.8) a promíchá. Roztok je při teplotě ≤ 4 °C stálý jeden měsíc.

3.7.3. Kalibrační roztoky

Do sady 50 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 0,5/1,0 a 2,0 ml pracovního standardního roztoku (bod 3.7.2). Doplní se po značku mobilní fází (bod 3.6) a promíchá. Tyto roztoky obsahují 0,5/1,0 a 2,0 g amprolia v 1 ml. Tyto roztoky se musí připravovat před použitím čerstvé.

3.8. Extrakční rozpouštědlo

Směs methanolu (bod 3.1) a vody, 2 + 1 (v+v)

4. **Přístroje**

4.1. Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem pro injektované objemy 100 µl

4.1.1. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm × 4 mm, katex Nucleosil 10 SA, náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná

4.1.2. UV detektor s nastavitelnou vlnovou délkou nebo detektor s diodovým polem

4.2. Membránový filtr, materiál PTFE, 0,45 µm

4.3. Membránový filtr, 0,22 µm

4.4. Ultrazvuková lázeň

4.5. Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka

5. **Postup**

5.1. *Obecně*

5.1.1. Slepý vzorek krmiva

Pro provedení zkoušky na výtěžnost (bod 5.1.2) se provede analýza pro kontrolu toho, že slepý vzorek krmiva neobsahuje ani amprolium, ani jiné rušivé látky. Slepý vzorek krmiva musí mít podobné složení jako vzorek a nesmí být zjištěno amprolium ani jiné rušivé látky.

5.1.2. Zkouška na výtěžnost

Provede se zkouška na výtěžnost u slepého vzorku krmiva, který byl obohacen přidáním takového množství amprolia, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Pro obohacení na obsah 100 mg/kg se převede 10,0 ml zásobního standardního roztoku (bod 3.7.1) do 250 ml kónické baňky a roztok se odpaří na objem přibližně 0,5 ml. Přidá se 50 g slepého vzorku krmiva. Důkladně se promíchá a vyčká 10 minut, znovu se několikrát promíchá a potom se se může začít s extrakcí (bod 5.2).

Není-li k dispozici slepý vzorek krmiva podobného složení jako vzorek (viz 5.1.1), lze provést zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídavku. V tom případě se vzorek, jenž má být analyzován, obohatí přidáním takového množství amprolia, které odpovídá jeho obsahu ve vzorku. Tento vzorek se potom zkouší společně se vzorkem neobohaceným a výtěžnost se vypočte odečtením.

5.2. *Extrakce*

5.2.1. Premixy (obsah amprolia < 1 %) a krmiva

Podle obsahu amprolia se do 500 ml kónické baňky naváží 5–40 g vzorku s přesností na 0,01 g a přidá se 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.8). Baňka se vloží na 15 minut do ultrazvukové lázně (bod 4.4). Poté se baňka z ultrazvukové lázně vyjme a jednu hodinu třepe na třepačce nebo míchá na magnetické míchačce (bod 4.5). Alikvotní část extraktu se zředí mobilní fází (bod 3.6) na obsah amprolia 0,5–2 µg/ml a promíchá se (viz poznámka 9.3). 5–10 ml tohoto zředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (bod 4.2). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.2.2. Premixy (obsah amprolia ≥ 1 %)

Podle obsahu amprolia se do 500 ml kónické baňky naváží 1–4 g premixu s přesností na 0,001 g a přidá se 200 ml extrakčního rozpouštědla (bod 3.8). Baňka se vloží na 15 minut do ultrazvukové lázně (bod 4.4). Poté se baňka z ultrazvukové lázně vyjme a jednu hodinu třepe na třepačce nebo míchá na magnetické míchačce (bod 4.5). Alikvotní část extraktu se zředí mobilní fází (bod 3.6) na obsah amprolia 0,5–2 µg/ml a promíchá se. 5–10 ml tohoto zředěného roztoku se přefiltruje přes membránový filtr (bod 4.2). Dále se pokračuje se stanovením HPLC (bod 5.3).

5.3. *Stanovení HPLC*

5.3.1. Parametry:

Následující podmínky jsou doporučené, lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.1.1):	125 mm × 4 mm, katex Nucleosil 10 SA, náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.6):	Směs acetonitrilu (bod 3.2), roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (bod 3.4) a roztoku chloristanu sodného (bod 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Průtok:	0,7–1 ml/min
Detekční vlnová délka:	264 nm
Objem nástřiku:	100 µl

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku (bod 3.7.3), který obsahuje 1,0 µg/ml, dokud se nedosáhne konstantních výšek píků a konstantních retenčních časů.

5.3.2. Kalibrační křivka

Provede se opakovaný nástřik každého kalibračního roztoku (bod 3.7.3) a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků pro každou koncentraci. Kalibrační křivka se vytvoří vynesením průměrných hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků proti příslušným koncentracím v µg/ml.

5.3.3. Roztok vzorku

Provede se opakovaný nástřik extraktu vzorku (bod 5.2) při použití stejného objemu jako u kalibračních roztoků a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků amprolia.

6. **Výpočet výsledků**

Z průměrné hodnoty výšky (plochy) píků amprolia u roztoku vzorku se podle kalibrační křivky (bod 5.3.2) stanoví koncentrace roztoku vzorku v µg/ml.

Obsah amprolia (w) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [mg/kg]$$

kde:

V = objem extrakčního rozpouštědla (bod 3.8) v ml podle bodu 5.2 (tj. 200 ml)

c = koncentrace amprolia v extraktu vzorku (bod 5.2) v µg/ml

f = faktor ředění podle bodu 5.2

m = hmotnost navážky vzorku v g

7. **Ověření výsledků**

7.1. *Identita*

Identitu analytu lze potvrdit simultánní chromatografií nebo využitím detektoru s diodovým polem, přičemž se porovnávají spektra extraktu vzorku (bod 5.2) a kalibračního roztoku (bod 3.7.3) obsahujícího 2,0 µg/ml.

7.1.1. Simultánní chromatografie

Roztok vzorku (bod 5.2) je obohacen přidáním vhodného množství kalibračního roztoku (bod 3.7.3). Přidané množství amprolia musí odpovídat obsahu amprolia v extraktu vzorku.

Přídavek se projeví pouze zvýšením píku amprolia, a to úměrně k přidanému množství a ředění extraktu. Šířka píku v polovině výšky se smí odchylovat od šířky původního píku amprolia v neobohaceném extraktu vzorku nejvýše o ± 10 %.

7.1.2. Detektor s diodovým polem

Výsledky jsou posuzovány podle těchto kritérií:

a) Při vlnové délce maximální absorpce vzorku i standardu musí být záznam spektra zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu stejný s přesností danou rozlišovací schopností detekčního systému. Pro detektor s diodovým polem se udává obvykle ± 2 nm.

b) Při vlnové délce mezi 210 a 320 nm se nesmí záznam spektra ve vzorku a standardu zaznamenaný ve vrcholu píku na chromatogramu lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže v žádném sledovaném bodě odchylka mezi dvěma spektry nepřesahuje 15 % absorbance standardního analytu.

c) Při vlnové délce mezi 210 a 320 nm se nesmí spektrum vzestupné části, vrcholu a sestupné části píku zkoušeného vzorku lišit od ostatních částí spektra v rozsahu 10–100 % relativní absorbance. Tohoto kritéria je dosaženo, jestliže jsou vykázána stejná maxima a jestliže ve všech sledovaných bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje nikde 15 % absorbance spektra ve vrcholu píku.

Jestliže některé z těchto kritérií není splněno, přítomnost analytu není potvrzena.

7.2. *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku nesmí překročit:

— 15 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu amprolia od 25 mg/kg do 500 mg/kg,

— 75 mg/kg u obsahu amprolia mezi 500 mg/kg a 1 000 mg/kg,

— 7,5 % vzhledem k vyšší hodnotě u obsahu amprolia nad 1 000 mg/kg.

7.3. *Výtěžnost*

Výtěžnost u obohaceného (slepého) vzorku musí činit nejméně 90 %.

8. **Výsledky kolaborativní studie**

Byla provedena kolaborativní studie, během níž byla analyzována tři krmiva pro drůbež (vzorky 1–3), jedno minerální krmivo (vzorek 4) a jeden premix (vzorek 5). Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	vzorek 1 (slepý vzorek krmiva)	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
průměr [mg/kg]	–	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	–	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	–	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
nominální obsah [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: počet laboratoří

n: počet jednotlivých hodnot

s_r: standardní odchylka opakovatelnosti

CV_r: variační koeficient opakovatelnosti

s_R: standardní odchylka reprodukovatelnosti

CV_R: variační koeficient reprodukovatelnosti

9. **Poznámky**

9.1. Obsahuje-li vzorek thiamin, objeví se pík thiaminu v chromatogramu krátce před píkem amprolia. Při použití této metody se amprolium a thiamin musí separovat. Nejsou-li amprolium a thiamin separovány kolonou (bod 4.1.1) použitou při této metodě, upraví se mobilní fáze (bod 3.6) nahrazením až 50 % acetonitrilu methanolem.

9.2. Podle britského lékopisu vykazuje spektrum roztoku amprolia (c = 0,02 mol/l) v kyselině chlorovodíkové (c = 0,1 mol/l) maxima při 246 nm a 262 nm. Absorbance by měla činit 0,84 při 246 nm a 0,80 při 262 nm.

9.3. Extrakt se vždy musí ředit mobilní fází, protože jinak se retenční čas píku amprolia může značně posouvat změnami iontové síly.

I) STANOVENÍ OBSAHU NARASINU

Obsah narasinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN ISO 14183 Krmiva – Stanovení obsahu monensinu, narasinu a salinomycinu – Metoda kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací.

J) STANOVENÍ OBSAHU NIKARBAZINU

Obsah nikarbazinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN 15782 Krmiva – Stanovení nikarbazinu – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

K) STANOVENÍ OBSAHU DEKOCHINÁTU

Obsah dekochinátu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN 16162 Krmiva – Krmiva – Stanovení decoquinátu metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

L) STANOVENÍ OBSAHU MONENSINU

Obsah monensinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN ISO 14183 Krmiva – Stanovení obsahu monensinu, narasinu a salinomycinu – Metoda kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací.

M) STANOVENÍ OBSAHU SALINOMYCINU

Obsah salinomycinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN ISO 14183 Krmiva – Stanovení obsahu monensinu, narasinu a salinomycinu – Metoda kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací.

N) STANOVENÍ OBSAHU SEMDURAMYCINU

Obsah semduramycinu se stanoví takto:

— metodou analýzy stanovenou v normě EN 17299 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Screening a stanovení povolených kokcidiostatik v doplňkových látkách a 1 % a 3 % úrovně křížové kontaminace a neregistrovaných kokcidiostatik a jednoho antibiotika v nízkých koncentracích v krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) nebo

— metodou stanovenou v normě EN ISO 16158 Krmiva – Stanovení obsahu semduramicinu – Metoda kapalinové chromatografie s použitím „stromového“ analytického postupu.

O) NORMY EN

Pro použití čl. 34 odst. 2 písm. a) nařízení (EU) 2017/625 jsou relevantní tyto normy EN:

EN ISO 30024 Krmiva – Stanovení aktivity fytázy

EN 17050 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení jodu v krmivech metodou ICP-MS

EN 17550 Krmiva: Stanovení karotenoidů v krmných směsích a premixech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV)

EN 15784 Krmiva: Metody vzorkování a analýzy – Detekce a stanovení počtu bakterií rodu *Bacillus* používaných jako doplňkové látky v krmivech

EN 15785 Krmiva: Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium*

EN 15786 Krmiva: Metody vzorkování a analýzy – Detekce a stanovení počtu bakterií rodu *Pediococcus* používaných jako doplňkové látky v krmivech

EN 15787 Krmiva: Metody vzorkování a analýzy – Detekce a stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus* používaných jako doplňkové látky v krmivech

EN 15788 Krmiva: Metody vzorkování a analýzy – Detekce a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* (*E. faecium*) používaných jako doplňkové látky v krmivech

EN 15789 Krmiva: Metody vzorkování a analýzy – Detekce a stanovení počtu bakterií *Saccharomyces cerevisiae* používaných jako doplňkové látky v krmivech

EN 15510 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, železa, zinku, mědi, manganu, kobaltu, molybdenu a olova metodou ICP-AES (pro účely analýzy doplňkových látek kobaltu a molybdenu)

EN 15621 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení vápníku, sodíku, fosforu, hořčíku, draslíku, síry, železa, zinku, mědi, manganu, kobaltu a molybdenu po tlakovém rozkladu metodou ICP-AES (pro účely analýzy doplňkové látky kobaltu)

EN 16159 Krmiva – Stanovení selenu metodou atomové absorpční spektrometrie s generováním hydridů (HGAAS) po mikrovlnném rozkladu (rozklad pomocí 65 % kyseliny dusičné a 30 % peroxidu vodíku) (pro účely analýzy doplňkové látky selenu)

EN 17053: Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení stopových prvků, těžkých kovů a dalších prvků v krmivech metodou ICP-MS (multimetoda) (pro účely analýzy doplňkových látek kobaltu, molybdenu a selenu)“

PŘÍLOHA V

„PŘÍLOHA V

METODY ANALÝZY PRO KONTROLU NEŽÁDOUCÍCH LÁTEK V KRMIVECH

A) STANOVENÍ OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB

KAPITOLA I

METODY ODBĚRU VZORKŮ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ANALÝZ

1. Oblast použití a definice

Vzorky určené pro úřední kontrolu obsahu polychlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů (PCDD), polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF), polychlorovaných bifenylů (PCB) s dioxinovým efektem ([1]) a PCB bez dioxinového efektu v krmivech se odebírají v souladu s ustanoveními přílohy I. Musí být použity kvantitativní požadavky v souvislosti s kontrolou látek nebo produktů rozložených v krmivu rovnoměrně, jak jsou stanoveny v bodě 5.1 přílohy I. Takto získané souhrnné vzorky se považují za reprezentativní pro šarže nebo části šarže, z nichž byly odebrány. Dodržení maximálních limitů stanovených ve směrnici 2002/32/ES se posuzuje na základě obsahů zjištěných v laboratorních vzorcích.

Pro účely této části se použijí definice stanovené v příloze I prováděcího nařízení Komise (EU) 2021/808 ([2]).

Kromě zmíněných definic se pro účely této části použijí tyto definice:

([1]) Tabulka faktorů toxické ekvivalence (TEF) pro PCDD, PCDF a PCB s dioxinovým efektem: WHO-TEF pro hodnocení nebezpečnosti pro člověka vycházející ze závěrů zasedání odborníků Světové zdravotnické organizace (WHO) – Mezinárodní program chemické bezpečnosti (IPCS), které se konalo v Ženevě v červnu 2005 (Martin Van den Berg et al. The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongener	Hodnota TEF	Kongener	Hodnota TEF
Dibenzo-*p*-dioxiny (PCDD) a dibenzo-*p*-furany (PCDF)		PCB s dioxinovým efektem Non-ortho PCB + Mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Použité zkratky: „T" = tetra, „Pe" = penta, „Hx" = hexa, „Hp" = hepta, „T" = chlor, „CDD" = chlordibenzo-p-dioxin, „CDF" = chlordibenzofuran, „CB" = chlorbifenyl.

([2]) Prováděcí nařízení Komise (EU) 2021/808 ze dne 22. března 2021 o provádění analytických metod pro rezidua farmakologicky účinných látek používaných u zvířat určených k produkci potravin a o interpretaci výsledků, jakož i o metodách, které se mají používat pro odběr vzorků, a o zrušení rozhodnutí 2002/657/ES a 98/179/ES (Úř. věst. L 180, 21.5.2021, s. 84).

„Screeningovými metodami“ se rozumí metody používané k identifikaci vzorků s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální limity nebo akční prahy. Tyto metody musí umožňovat nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Screeningové metody musí být založeny na bioanalytických metodách nebo metodách GC-MS. Výsledky u vzorků, které překročily mezní hodnotu pro kontrolu dodržení maximálních limitů, musí být ověřeny úplnou opětovnou analýzou z původního vzorku pomocí konfirmační metody.

„Konfirmačními metodami“ se rozumí metody, které poskytují úplné nebo doplňující informace pro jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem u maximálního limitu nebo, v případě potřeby, u akčního prahu. Tyto metody využívají plynovou chromatografii/hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (GC-HRMS) nebo plynovou chromatografii/tandemovou hmotnostní spektrometrii (GC-MS/MS).

2. Dodržení maximálního limitu v šarži nebo části šarže

2.1. *Pokud jde o PCB bez dioxinového efektu*

Šarže nebo část šarže vyhovuje maximálnímu limitu, pokud výsledek analýzy pro sumu PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 a PCB 180 (dále jen „PCB bez dioxinového efektu“) nepřekračuje maximální limit stanovený ve směrnici 2002/32/ES, při zohlednění rozšířené nejistoty měření ([3]). Šarže nebo část šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému ve směrnici 2002/32/ES, pokud střední hodnota dvou horních odhadů ([4]) výsledků analýzy získaná opakovanou analýzou ([5]) při zohlednění rozšířené nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit, tj. k posouzení souladu se použije analyzovaná koncentrace poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření.

Rozšířená nejistota měření se vypočte s použitím koeficientu rozšíření 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. Šarže nebo část šarže nevyhovuje, pokud je střední hodnota naměřených hodnot minus rozšířená nejistota měření střední hodnoty vyšší než maximální limit.

Pravidla zmíněná ve výše uvedených odstavcích tohoto bodu se použijí na výsledky analýz získané u vzorku pro úřední kontrolu. V případě analýzy pro účely druhého odborného stanoviska nebo srovnání se použijí vnitrostátní předpisy.

2.2. *Pokud jde o PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem*

Šarže nebo část šarže je v souladu s maximálním limitem, pokud výsledek jedné analýzy

— provedené screeningovou metodou s mírou falešně vyhovujících výsledků nižší než 5 % naznačuje, že obsah nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovený ve směrnici 2002/32/ES,

— provedené konfirmační metodou nepřekračuje příslušný maximální limit pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanovený ve směrnici 2002/32/ES, při zohlednění rozšířené nejistoty měření.

([3]) V příslušném případě je třeba se řídit zásadami popsanými v dokumentu „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).

([4]) Koncept „horního odhadu“ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití hodnoty meze stanovitelnosti. Koncept „dolního odhadu“ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru použití nulové hodnoty. Koncept „středního odhadu“ vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru použití poloviny hodnoty meze stanovitelnosti.

([5]) Opakovanou analýzou se rozumí samostatná analýza sledovaných analytů na základě druhého alikvotu téhož homogenizovaného vzorku. Obecně se použijí požadavky na opakovanou analýzu stanovené v příloze II kapitole C bodě 3. Avšak u metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ^{13}C pro příslušné analyty je opakovaná analýza nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení není vyhovující. Opakovaná analýza je nezbytná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného pomíchání vzorků. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od potvrzení opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální limit.

U screeningových zkoušek se pro rozhodnutí o souladu vzorku s příslušnými maximálními limity stanovenými buď pro PCDD/PCDF, nebo pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem stanoví mezní hodnota.

Šarže nebo část šarže nevyhovuje maximálnímu limitu stanovenému ve směrnici 2002/32/ES, pokud střední hodnota dvou horních odhadů ([6]) výsledků analýzy získaná opakovanou analýzou ([7]) s použitím konfirmační metody při zohlednění rozšířené nejistoty měření takřka nepochybně překračuje maximální limit, tj. k posouzení souladu se použije analyzovaná koncentrace poté, co byla odečtena rozšířená nejistota měření.

Rozšířená nejistota měření se vypočte s použitím koeficientu rozšíření 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. Šarže nebo část šarže nevyhovuje, pokud je střední hodnota naměřených hodnot minus rozšířená nejistota měření střední hodnoty vyšší než maximální limit.

Pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se použije součet odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýz u PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

Pravidla zmíněná ve výše uvedených odstavcích tohoto bodu se použijí na výsledky analýz získané u vzorku pro úřední kontrolu. V případě analýzy pro účely obhajoby nebo srovnání se použijí vnitrostátní předpisy.

3. Výsledky překračující akční prahy stanovené v příloze II směrnice 2002/32/ES

Akční prahy slouží jako nástroj k identifikaci vzorků v případech, kdy je nezbytné zjistit zdroj kontaminace a přijmout opatření pro jeho omezení nebo odstranění. Screeningové metody stanoví vhodné mezní hodnoty k identifikaci uvedených vzorků. V případě, kdy je zjištění zdroje kontaminace a jeho omezení nebo odstranění velmi náročné, je účelné potvrdit překročení akčního prahu opakovanou analýzou s použitím konfirmační metody při zohlednění rozšířené nejistoty měření ([8]).

Kapitola II

PŘÍPRAVA VZORKŮ A POŽADAVKY NA METODY ANALÝZY POUŽITÉ PŘI ÚŘEDNÍ KONTROLE OBSAHU DIOXINŮ (PCDD/PCDF) A PCB S DIOXINOVÝM EFEKTEM V KRMIVECH

1. Oblast použití

Požadavky stanovené v této kapitole se použijí při analýze krmiv pro úřední kontrolu obsahu PCDD/PCDF substituovaných v polohách 2,3,7,8 a PCB s dioxinovým efektem a pro přípravu vzorků a analytické požadavky k jiným regulačním účelům, včetně kontrol prováděných provozovatelem krmivářského podniku k zajištění dodržování ustanovení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ([9]).

Sledování přítomnosti PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v krmivech může být prováděno dvěma různými druhy analytických metod:

([6]) Koncept „horního odhadu“ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě toxického ekvivalentu (TEQ) použití hodnoty meze stanovitelnosti. Koncept „dolního odhadu“ vyžaduje pro příspěvek každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě TEQ použití nulové hodnoty. Koncept „středního odhadu“ vyžaduje pro výpočet příspěvku každého nekvantifikovaného kongeneru k hodnotě TEQ použití poloviny hodnoty meze stanovitelnosti.

([7]) Obecně se použijí požadavky na opakovanou analýzu stanovené v příloze II kapitole C bodě 3. Avšak u konfirmačních metod s použitím vnitřního standardu značeného izotopem ^{13}C pro příslušné analyty je opakovaná analýza nezbytná pouze tehdy, pokud výsledek prvního stanovení není vyhovující. Opakovaná analýza je nezbytná k vyloučení možnosti vnitřní křížové kontaminace nebo náhodného pomíchání vzorků. Je-li analýza prováděna v rámci kontaminační aféry, lze od potvrzení opakovanou analýzou upustit, pokud lze zpětně vysledovat spojitost vzorků vybraných pro analýzu s danou kontaminační aférou a zjištěný obsah je výrazně vyšší než maximální limit.

([8]) Totožné vysvětlení a požadavky na provedení opakované analýzy pro kontrolu akčních prahů jako v poznámce pod čarou 5 pro maximální limity.

([9]) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ze dne 12. ledna 2005, kterým se stanoví požadavky na hygienu krmiv (Úř. věst. L 35, 8.2.2005, s. 1).

a) *Screeningové metody*

Cílem screeningových metod je identifikovat vzorky s obsahem PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem převyšujícím maximální limity nebo akční prahy. Screeningové metody zajistí nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje možnost zjistit nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Cílem jejich použití je zabránit falešně vyhovujícím výsledkům. Tyto metody mohou zahrnovat bioanalytické metody a metody GC-MS.

Screeningové metody porovnávají výsledek analýzy s mezní hodnotou, a umožňují tak jednoznačné rozhodnutí (ano/ne) o případném překročení maximálního limitu nebo akčního prahu. Koncentraci PCDD/PCDF a sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích, u nichž panuje podezření, že jsou nevyhovující, pokud jde o maximální limit, je třeba stanovit nebo potvrdit konfirmační metodou.

Kromě toho mohou screeningové metody udávat orientační obsah PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku. V případě použití bioanalytických screeningových metod se výsledek vyjádří v bioanalytických ekvivalentech (BEQ), zatímco v případě použití fyzikálně-chemických metod GC-MS se vyjádří v toxických ekvivalentech (TEQ). Numericky vyjádřené výsledky screeningových metod jsou vhodné k prokázání souladu nebo podezření na nedodržení nebo překročení akčních prahů a udávají orientační rozmezí úrovní pro případ následné zkoušky pomocí konfirmačních metod. Nejsou vhodné pro účely, jako je hodnocení úrovní pozadí, odhad příjmu, sledování vývoje úrovní v čase nebo přehodnocení akčních prahů a maximálních limitů.

b) *Konfirmační metody*

Konfirmační metody umožňují jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem přítomných ve vzorku a poskytují úplné informace o úrovni jednotlivých kongenerů. Uvedené metody proto umožňují kontrolu maximálních limitů a akčních prahů, včetně konfirmace výsledků získaných pomocí screeningových metod. Kromě toho mohou být výsledky použity i pro jiné účely, jako je stanovení nízkých úrovní pozadí při sledování krmiv, sledování vývoje v čase, posouzení expozice a vytvoření databáze za účelem případného přehodnocení akčních prahů a maximálních limitů. Rovněž jsou významné pro stanovení zastoupení kongenerů za účelem zjištění zdroje možné kontaminace. Tyto metody využívají GC-HRMS. Pro konfirmaci souladu nebo nesouladu s maximálními limity lze rovněž použít GC-MS/MS.

2. **Souvislosti**

Pro výpočet koncentrací TEQ se koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku vynásobí jejich příslušnými faktory toxické ekvivalence (TEF) (viz poznámka 27 v kapitole I), sečtou se a výsledná suma je celkovou koncentrací sloučenin s dioxinovým efektem vyjádřenou v TEQ.

Pro účely této části A se schválenou specifickou mezí stanovitelnosti jednotlivého kongeneru rozumí nejnižší obsah analytu, který lze měřit s rozumnou mírou statistické jistoty, splňující kritéria pro identifikaci, jež jsou popsána v mezinárodně uznávaných normách, například v normě EN 16215:2012 (Krmiva – Stanovení dioxinů a PCB podobných dioxinům metodou GC/HRMS a indikátorů PCB metodou GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

Mez stanovitelnosti jednotlivého kongeneru může být identifikována jako:

a) koncentrace analytu v extraktu vzorku, jež dává instrumentální odezvu na dvou různých iontech, které mají být monitorovány při poměru signál-šum 3:1 pro méně intenzivní signál z hrubých dat, nebo

b) pokud výpočet signál-šum z technických důvodů neposkytuje spolehlivé výsledky, jako nejnižší bod koncentrace na kalibrační křivce, který vykazuje přijatelnou (≤ 30 %) a stálou (měřeno alespoň na začátku a na konci analytické série vzorků) odchylku od průměrného relativního odezvového faktoru vypočteného pro všechny body na kalibrační křivce v každé sérii vzorků. Mez kvantifikace (LOQ) se vypočte z nejnižšího bodu koncentrace, přičemž se zohlední výtěžnost vnitřních standardů a množství vzorku.

Bioanalytické screeningové metody neposkytnou výsledky na úrovni kongeneru, ale pouze orientační hodnotu ([10]) úrovně TEQ, vyjádřené v BEQ, aby byla zohledněna skutečnost, že ne všechny sloučeniny přítomné v extraktu vzorku, který při zkoušce dává odezvu, nutně splňují všechny požadavky principu TEQ.

Screeningové a konfirmační metody mohou být použity pouze pro kontrolu určité matrice, pokud jsou tyto metody dostatečně citlivé, aby spolehlivě zjistily hladiny na úrovni akčního prahu nebo maximálního limitu.

3. **Požadavky na zajištění kvality**

3.1. Na každém stupni odběru vzorků a analýzy se přijmou opatření k zamezení křížové kontaminace.

3.2. Vzorky musí být uchovávány a přepravovány ve skleněných, hliníkových, polypropylenových nebo polyethylenových nádobách vhodných pro skladování bez jakéhokoli vlivu na úrovně PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem ve vzorcích. Z nádoby na vzorky se odstraní stopy papírového prachu.

3.3. Vzorky se uchovávají a přepravují tak, aby byla zachována integrita vzorku krmiv.

3.4. Pokud je to relevantní, jednotlivé laboratorní vzorky se jemně rozemelou a důkladně promísí postupem, u něhož je prokázáno, že se jím dosáhne úplné homogenizace (např. rozemletím tak, aby vzorek prošel sítem s oky o velikosti 1 mm). Je-li vlhkost vzorků příliš vysoká, musí se vzorky před rozemletím sušit.

3.5. Je vždy důležité zkontrolovat činidla, skleněné nádobí a vybavení z hlediska možného vlivu na výsledky založené na TEQ nebo BEQ.

3.6. Provede se slepý pokus, při němž se provede celý analytický postup bez vzorku.

3.7. U bioanalytických metod se u veškerého při analýze použitého skleněného nádobí a rozpouštědel potvrdí, že jsou prosty sloučenin, které mohou bránit zjištění cílových sloučenin v pracovním rozsahu. Skleněné nádobí se vypláchne rozpouštědly nebo zahřeje na teploty vhodné pro odstranění stop PCDD/PCDF, sloučenin s dioxinovým efektem a rušivých sloučenin z jeho povrchu.

3.8. Množství vzorku použité pro extrakci musí být dostatečné, aby byly splněny požadavky s ohledem na dostatečně nízký pracovní rozsah včetně koncentrací maximálních limitů nebo akčního prahu.

3.9. Specifické postupy přípravy vzorku použité pro zkoumané produkty musí splňovat mezinárodně uznávané metodiky, např. EN ISO 6498.

4. **Požadavky na laboratoře**

4.1. V souladu s ustanoveními nařízení (EU) 2017/625 musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s pokyny ISO/IEC Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění analytické kvality. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025. Je nutno se řídit zásadami popsanými v technických pokynech pro odhad nejistoty měření a meze stanovitelnosti pro analýzu PCDD/PCDF a PCB ([11]).

4.2. Odbornost laboratoře prokazuje soustavná úspěšná účast v mezilaboratorních studiích týkajících se stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v příslušných matricích krmiv a rozsazích koncentrací.

([10]) Bioanalytické metody nejsou specifické pro kongenery zahrnuté v systému TEF. V extraktu vzorku mohou být přítomny jiné strukturně příbuzné AhR-aktivní sloučeniny, které přispívají k celkové odezvě. Proto výsledky bioanalýzy nelze považovat za odhad, ale spíše za orientační hodnotu úrovně TEQ ve vzorku.

([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].

4.3. Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, musí úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu, za účelem jak kontroly kvality, tak konfirmace výsledku analýzy podezřelých vzorků.

5. **Základní požadavky, které musí splňovat analytický postup u dioxinů (PCDD/PCDF) a PCB s dioxinovým efektem**

5.1. *Nízký pracovní rozsah a meze stanovitelnosti*

V případě PCDD/PCDF musí být zjistitelná množství z důvodu extrémní toxicity některých těchto sloučenin na horní úrovni femtogramů (10^{-15} g). V případě většiny kongenerů PCB je dostatečná již mez stanovitelnosti na úrovni nanogramů (10^{-9} g). Pro měření toxičtějších kongenerů PCB s dioxinovým efektem (zejména non-ortho substituovaných kongenerů) musí nejspodnější část pracovního rozsahu dosahovat nízkých úrovní pikogramů (10^{-12} g). U všech ostatních kongenerů PCB je dostatečná již mez stanovitelnosti na úrovni nanogramů (10^{-9} g).

5.2. *Vysoká selektivita (specifičnost)*

5.2.1. Je třeba rozlišit PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a řadu jiných sloučenin, které se extrahují společně s těmito látkami, mohou rušit při jejich stanovování a jsou přítomny v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace sledovaných analytů. Pro metody GC-MS je třeba rozlišení mezi různými kongenery, např. mezi toxickými kongenery (např. sedmnácti PCDD/PCDF substituovanými v polohách 2,3,7,8 a dvanácti PCB s dioxinovým efektem) a ostatními kongenery.

5.2.2. Bioanalytické metody musí být schopny detekovat cílové sloučeniny jako sumu PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem. Přečištění vzorku se zaměří na odstranění sloučenin způsobujících falešně nevyhovující výsledky nebo sloučenin, které mohou způsobovat snížení odezvy vedoucí k falešně vyhovujícím výsledkům.

5.3. *Vysoká přesnost (pravdivost a preciznost, zjevná výtěžnost biologické zkoušky)*

5.3.1. U metod GC-MS musí stanovení poskytovat správný odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Vysoká přesnost je nezbytná k tomu, aby nedošlo k zamítnutí výsledku analýzy vzorku na základě malé spolehlivosti stanovené úrovně TEQ. Přesnost je vyjádřena *pravdivostí* (rozdílem mezi střední naměřenou hodnotou analytu v certifikovaném materiálu a jeho certifikovanou hodnotou, vyjádřeným v procentech této hodnoty) a *precizností* (RSD_R je relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek reprodukovatelnosti).

5.3.2. Pro bioanalytické metody se určí zjevná výtěžnost biologické zkoušky. Zjevnou výtěžností biologické zkoušky se rozumí úroveň BEQ vypočtená z kalibrační křivky TCDD nebo PCB 126 upravená o hodnoty slepého stanovení a poté vydělená úrovní TEQ určenou konfirmační metodou. Jejím účelem je korekce činitelů, jako je ztráta PCDD/PCDF a sloučenin s dioxinovým efektem během extrakce a čištění, současně extrahované sloučeniny zesilující nebo tlumící odezvu (agonistické a antagonistické účinky), kvalita kalibrace nebo rozdíly mezi hodnotami TEF a relativní účinnosti (REP). Zjevná výtěžnost biologické zkoušky se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem sledované úrovně.

5.4. *Validace v rozsahu maximálního limitu a obecná opatření pro kontrolu kvality*

5.4.1. Laboratoře musí prokázat účinnost metody v rozsahu maximálního limitu, např. v polovině, jednonásobku nebo dvojnásobku maximálního limitu, a to s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu, a sice během validace a během rutinní analýzy.

5.4.2. Jako opatření pro vnitřní kontrolu kvality se provádějí pravidelná slepá kontrolní stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo analýzy kontrolních vzorků (nejlépe certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici). Ze slepých kontrolních stanovení, stanovení s obohacenými vzorky nebo analýz kontrolních vzorků se vyhotoví a ověří grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická účinnost je v souladu s požadavky.

5.5. *Mez stanovitelnosti*

5.5.1. Pro bioanalytické screeningové metody není stanovení meze stanovitelnosti (LOQ) nezbytné, příslušná metoda však musí prokázat, že umožňuje rozlišení mezi hodnotou slepého stanovení a mezní hodnotou. Při poskytování úrovně BEQ musí být stanovena oznamovací mez pro vzorky s odezvou nižší než tato úroveň. Musí být prokázáno, že se oznamovací mez významně (nejméně trojnásobně) liší od slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup s odezvou nižší než pracovní rozsah. Vypočte se proto ze vzorků obsahujících cílové sloučeniny přibližně v požadované minimální úrovni, a nikoli z poměru signál-šum nebo ze slepé zkoušky.

5.5.2. Mez stanovitelnosti u konfirmační metody musí činit přibližně jednu pětinu maximálního limitu.

5.6. *Analytická kritéria*

Pro spolehlivé výsledky konfirmačních nebo screeningových metod musí být v rozsahu maximálního limitu splněna následující kritéria pro hodnotu TEQ nebo BEQ, ať už je určena jako celkový TEQ nebo celkový BEQ (jako suma PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem), nebo samostatně pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

	Screening pomocí bioanalytických nebo fyzikálně-chemických metod	Konfirmační metody
Míra falešně vyhovujících výsledků (*)	< 5 %	
Pravdivost		– 20 % až + 20 %
Opakovatelnost (RSD_r)	< 20 %	
Mezilehlá preciznost (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) s ohledem na maximální limity

5.7. *Zvláštní požadavky na screeningové metody*

5.7.1. Pro screening mohou být použity jak metody GC-MS, tak bioanalytické metody. Metody GC-MS musí splňovat požadavky stanovené v bodě 6. Pro buněčné bioanalytické metody jsou zvláštní požadavky stanoveny v bodě 7.

5.7.2. Laboratoře, které pro rutinní kontrolu vzorků používají screeningové metody, musí úzce spolupracovat s laboratořemi používajícími konfirmační metodu.

5.7.3. Během rutinní analýzy je nutné ověřovat účinnost příslušné screeningové metody, a to kontrolou kvality při analýzách a průběžnou validací metody. Zavede se stálý program kontroly vyhovujících výsledků.

5.7.4. Kontrola možného potlačení buněčné odezvy a cytotoxicity:

20 % extraktů vzorků se změří při rutinním screeningu bez přidání a s přidáním 2,3,7,8-TCDD v množství odpovídajícím maximálnímu limitu nebo akčnímu prahu, aby se zjistilo, zda odezva není potlačována rušivými látkami přítomnými v extraktu vzorku. Naměřená koncentrace u obohaceného vzorku se porovná se sumou koncentrace neobohaceného extraktu a koncentrace obohacující látky. Pokud je tato naměřená koncentrace o více než 25 % nižší než vypočtená (souhrnná) koncentrace, svědčí to o tom, že možná dochází k potlačení odezvy, a dotčený vzorek musí být podroben konfirmační analýze pomocí GC-HRMS. Výsledky musí být zaznamenány v grafech kontroly kvality.

5.7.5. Kontrola kvality u vyhovujících vzorků

Přibližně 2 až 10 % vyhovujících vzorků, v závislosti na matrici vzorků a zkušenostech laboratoře, musí být potvrzeno pomocí GC-HRMS.

5.7.6. Určení míry falešně vyhovujících vzorků na základě údajů z kontroly kvality:

Určí se míra falešně vyhovujících výsledků na základě screeningu vzorků, jejichž výsledek je nižší a vyšší než maximální limit nebo akční práh. Skutečná míra falešně vyhovujících výsledků musí být nižší než 5 %. Je-li k dispozici nejméně 20 potvrzených výsledků z kontroly kvality vyhovujících vzorků na matrici/matricovou skupinu, vyvodí se závěry ohledně míry falešně vyhovujících výsledků z této databáze. Do minimálního počtu 20 výsledků pro hodnocení míry falešně vyhovujících výsledků se mohou zahrnout i výsledky ze vzorků analyzovaných pomocí kruhových testů nebo při kontaminačních aférách, které pokrývají rozsah koncentrace až např. do dvojnásobku maximálního limitu. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, které představují různé zdroje.

Ačkoli se mají screeningové zkoušky přednostně zaměřit na zjištění vzorků přesahujících akční práh, je kritériem pro stanovení míry falešně vyhovujících vzorků maximální limit, při zohlednění rozšířené nejistoty měření konfirmační metody.

5.7.7. Potenciálně nevyhovující vzorky ze screeningu musí být vždy ověřeny úplnou opakovanou analýzou původního vzorku pomocí konfirmační metody analýzy. Tyto vzorky mohou být také použity pro vyhodnocení míry falešně nevyhovujících výsledků. U screeningových metod je mírou falešně nevyhovujících výsledků podíl výsledků, které konfirmační analýza potvrdí jako vyhovující, zatímco při předchozím screeningu byl vzorek prohlášen za potenciálně nevyhovující. Hodnocení výhodnosti použití screeningové metody musí vycházet z porovnání falešně nevyhovujících výsledků a celkového počtu kontrolovaných vzorků. Tento poměr musí být dostatečně nízký, aby bylo možné považovat používání příslušného screeningového nástroje za výhodné.

5.7.8. Bioanalytické metody musí při validačních podmínkách poskytovat platnou orientační hodnotu úrovně TEQ, vypočtené a vyjádřené jako BEQ.

Pro bioanalytické metody prováděné za podmínek opakovatelnosti je vnitrolaboratorní RSD_r obvykle menší než za podmínek reprodukovatelnosti RSD_R.

6. Zvláštní požadavky, které musí splňovat metody GC-MS, aby vyhovovaly pro účely screeningu nebo konfirmace

6.1. *Přijatelné rozdíly mezi horním a dolním odhadem výsledků WHO-TEQ*

Rozdíl mezi horním a dolním odhadem nesmí překročit 20 % pro konfirmaci překročení maximálního limitu nebo, v případě potřeby, akčních prahů.

6.2. *Kontrola výtěžnosti*

6.2.1. Vnitřní standardy 2,3,7,8-chlor-substituovaných PCDD/PCDF značené izotopem ^{13}C a vnitřní standardy PCB s dioxinovým efektem značené izotopem ^{13}C musí být přidány na samém začátku analýzy, např. před extrakcí, aby bylo možné analytický postup validovat. Alespoň jeden kongener musí být přidán pro každou z tetra- až okta-chlorovaných homologických skupin PCDD/PCDF a alespoň jeden kongener pro každou z homologických skupin PCB s dioxinovým efektem (nebo alespoň jeden kongener pro každou skupinu vybraných iontů při použití hmotnostní spektrometrie v režimu registrace vybraných iontů použitou pro sledování PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). V případě konfirmačních metod se použije všech 17 vnitřních standardů 2,3,7,8-substituovaných PCDD/PCDF značených izotopem ^{13}C a všech 12 vnitřních standardů PCB s dioxinovým efektem značených izotopem ^{13}C.

6.2.2. Relativní odezvové faktory se s pomocí vhodných kalibračních roztoků stanoví také pro kongenery, pro něž nebyly přidány sloučeniny značené izotopem ^{13}C.

6.2.3. U krmiv rostlinného původu a krmiv živočišného původu s obsahem tuku nižším než 10 % je přidání vnitřních standardů před extrakcí povinné. U krmiv živočišného původu s obsahem tuku vyšším než 10 % lze vnitřní standardy přidat buď před extrakcí tuku, nebo po ní. Vhodným způsobem se validuje účinnost extrakce, a to v závislosti na fázi, ve které se přidávají vnitřní standardy.

6.2.4. Před analýzou metodou GC-MS musí být přidány jeden nebo dva obohacené standardy (recovery standardy) pro stanovení výtěžnosti.

6.2.5. Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U konfirmačních metod se výtěžnost jednotlivých vnitřních standardů musí pohybovat v rozmezí 60 až 120 %. Nižší nebo vyšší hodnota výtěžnosti u jednotlivých kongenerů, zejména některých hepta- a okta-chlorovaných dibenzo-*p*-dioxinů a dibenzofuranů, je přípustná pod podmínkou, že jejich příspěvek k hodnotě TEQ nepřesáhne 10 % celkové hodnoty TEQ (na základě sumy PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem). U screeningových metod GC-MS se výtěžnost musí pohybovat v rozmezí 30 až 140 %.

6.3. *Odstranění rušivých látek*

— Separace PCDD/PCDF od rušivých chlorovaných sloučenin, jako jsou PCB bez dioxinového efektu a chlorované difenylethery, se provede vhodnými chromatografickými technikami (nejlépe na florisilové, aluminové a/nebo uhlíkové koloně).

— Separace izomerů pomocí plynové chromatografie musí být < 25 % překryvu mezi píky 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibrace pomocí standardní křivky*

Rozsah kalibrační křivky musí pokrývat odpovídající rozsah maximálního limitu nebo akčních prahů.

6.5. *Zvláštní kritéria pro konfirmační metody*

— Pro GC-HRMS:

V případě HRMS musí být rozlišení zpravidla vyšší nebo rovno 10 000 v celém rozsahu hmotností při 10 % sedle.

Splnění dalších identifikačních a konfirmačních kritérií podle mezinárodně uznávaných norem, například normy EN 16215:2012 (Krmiva – Stanovení dioxinů a PCB podobných dioxinům metodou GC/HRMS a indikátorů PCB metodou GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí.

— Pro GC-MS/MS:

Sledování alespoň dvou specifických prekurzorových iontů, každý s jedním odpovídajícím specifickým přechodovým produktovým iontem pro všechny značené a neznačené analyty v rozsahu analýzy.

Nejvyšší přípustná tolerance relativní intenzity iontů v rozmezí ± 15 % na vybrané přechodové produktové ionty ve srovnání s vypočtenými nebo naměřenými hodnotami (průměr z kalibračních standardů), za použití identických MS/MS podmínek, zejména kolizní energie a tlaku kolizního plynu, pro každý přechod analytu.

Rozlišení pro každý quadrupol má být nastaveno tak, aby se rovnalo nebo bylo lepší než jednotkové hmotnostní rozlišení (jednotkové hmotnostní rozlišení: dostatečné rozlišení pro separaci dvou píků jedné jednotky hmotnosti), za účelem minimalizování možné interference sledovaných analytů.

Splnění dalších kritérií podle mezinárodně uznávaných norem, například normy EN 16215:2012 (Krmiva – Stanovení dioxinů a PCB podobných dioxinům metodou GC/HRMS a indikátorů PCB metodou GC/HRMS) a/nebo v metodách EPA 1613 a 1668 ve znění pozdějších revizí, s výjimkou povinnosti použití GC/HRMS.

7. ZVLÁŠTNÍ POŽADAVKY NA BIOANALYTICKÉ METODY

Bioanalytické metody jsou metody založené na využití biologických principů, jako jsou buněčné testy, receptorové testy nebo imunologické testy. V tomto bodě se stanoví obecné požadavky na bioanalytické metody.

Screeningové metody v zásadě klasifikují vzorky jako vyhovující nebo vzorky podezřelé jako nevyhovující. Za tímto účelem se vypočtená úroveň BEQ porovnává s mezní hodnotou (viz bod 7.3). Vzorky s výsledkem nižším než mezní hodnota se považují za vyhovující, vzorky s výsledkem rovnajícím se mezní hodnotě nebo vyšším se považují za podezřelé jako nevyhovující a je nutné provést jejich analýzu pomocí konfirmační metody. Prakticky může jako mezní hodnota sloužit úroveň BEQ odpovídající dvěma třetinám maximálního limitu, pokud je zajištěna míra falešně vyhovujících vzorků nižší než 5 % a přijatelná míra falešně nevyhovujících vzorků. Při odlišném maximálním limitu pro PCDD/PCDF a pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem vyžaduje kontrola souladu vzorků bez frakcionace vhodné mezní hodnoty pro biologickou zkoušku pro PCDD/PCDF. Pro kontrolu vzorků překračujících akční prahy je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento příslušného akčního prahu.

Je-li orientační úroveň vyjádřena v BEQ, musí být výsledky vzorku v pracovním rozsahu a překračovat oznamovací mez (viz body 7.1.1 a 7.1.6).

7.1. *Hodnocení odezvy zkoušky*

7.1.1. Obecné požadavky

— Při výpočtu koncentrace z kalibrační křivky TCDD vykáží hodnoty na horním konci křivky velký křivkový rozptyl (vysoký variační koeficient (CV)). Pracovní rozsah je oblast, kde je tento CV menší než 15 %. Nejspodnější část pracovního rozsahu (oznamovací mez) musí být stanovena tak, aby nejméně trojnásobně přesahovala hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup. Horní část pracovního rozsahu obvykle představuje hodnota EC_{70} (70 % maximální účinné koncentrace), je však nižší, pokud je CV v tomto rozsahu vyšší než 15 %. Pracovní rozsah se stanoví během validace. Mezní hodnoty (viz bod 7.3) musí být uvnitř pracovního rozsahu.

— Standardní roztoky a extrakty vzorku se zkouší třikrát nebo alespoň duplicitně. Při duplicitních zkouškách musí standardní roztok nebo kontrolní extrakt zkoušený ve čtyřech až šesti jamkách rozložených na destičce poskytnout odezvu nebo koncentraci (možné pouze v pracovním rozsahu) vycházející z CV < 15 %.

7.1.2. Kalibrace

7.1.2.1. Kalibrace pomocí standardní křivky

— Za účelem výpočtu úrovně BEQ v extraktu a následně ve vzorku lze úroveň ve vzorcích odhadnout porovnáním jejich odezvy s odezvou kalibrační křivky TCDD (nebo PCB 126 nebo standardní směsi PCDD/PCDF/PCB s dioxinovým efektem).

— Kalibrační křivky musí obsahovat osm až dvanáct koncentrací (alespoň duplicitních), s dostatečným počtem koncentrací ve spodní části křivky (pracovním rozsahu). Zvláštní pozornost musí být věnována kvalitě proložení kalibračních bodů křivkou v pracovním rozsahu. Hodnota R^2 sama o sobě má pouze zanedbatelný nebo žádný význam při hodnocení kvality proložení kalibračních bodů křivkou při nelineární regresi. Lepšího proložení se dosáhne minimalizací rozdílu mezi vypočtenými a zjištěnými úrovněmi v pracovním rozsahu křivky (např. minimalizací sumy druhých mocnin reziduí).

— Od odhadované úrovně v extraktu vzorku se následně odečte úroveň BEQ vypočtená pro slepý vzorek matrice nebo rozpouštědla (aby se zohlednily nečistoty z použitých rozpouštědel a chemikálií) a provede se korekce na zjevnou výtěžnost (vypočtenou na základě úrovně BEQ vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního limitu nebo akčního prahu). Pro provedení korekce na výtěžnost musí být zjevná výtěžnost v požadovaném rozsahu (viz bod 7.1.4). Referenční vzorky použité pro korekci na výtěžnost musí splňovat požadavky stanovené v bodě 7.2.

7.1.2.2. Kalibrace pomocí referenčních vzorků

Případně lze použít kalibrační křivku zhotovenou alespoň ze čtyř referenčních vzorků (viz bod 7.2.4): jednoho slepého matričního vzorku plus tří referenčních vzorků na polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního limitu nebo akčního prahu, čímž odpadne nutnost odečtu hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost, pokud se vlastnosti matrice referenčních vzorků kryjí s vlastnostmi neznámých vzorků. V tomto případě lze odezvu odpovídající dvěma třetinám maximálního limitu (viz bod 7.3) vypočíst přímo z těchto vzorků a použít ji jako mezní hodnotu. Pro kontrolu vzorků překračujících akční prahy je vhodnou mezní hodnotou přiměřené procento těchto akčních prahů.

7.1.3. Samostatné stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem

Extrakty lze rozdělit do frakcí obsahujících PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, což umožňuje získání samostatné orientační hodnoty úrovně TEQ pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem (v BEQ). Pro hodnocení výsledků pro frakci obsahující PCB s dioxinovým efektem se přednostně použije kalibrační křivka standardu PCB 126.

7.1.4. Zjevná výtěžnost biologické zkoušky

Zjevná výtěžnost biologické zkoušky se vypočte z vhodných referenčních vzorků s reprezentativním zastoupením kongenerů kolem maximálního limitu nebo akčního prahu a vyjádří se jako procento úrovně BEQ v porovnání s úrovní TEQ. V závislosti na použitém typu zkoušky a použitých TEF ([12]) mohou rozdíly mezi faktory TEF a REP pro PCB s dioxinovým efektem způsobit nízkou zjevnou výtěžnost u PCB s dioxinovým efektem v porovnání s PCDD/PCDF. Proto při samostatném stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí být zjevná výtěžnost biologických zkoušek následující: u PCB s dioxinovým efektem 20 % až 60 %, u PCDD/PCDF 50 % až 130 % (rozmezí platná pro kalibrační křivku TCDD). Jelikož podíl PCB s dioxinovým efektem na sumě PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se může u různých matric a vzorků lišit, odráží se tyto rozdíly i ve zjevné výtěžnosti biologických zkoušek pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, která se má pohybovat v rozmezí 30 % až 130 %. Důsledky případné podstatné revize hodnot TEF pro právní předpisy Unie týkající se PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem budou vyžadovat revizi těchto rozmezí.

7.1.5. Kontrola výtěžnosti pro účely čištění

Při validaci je nutné zkontrolovat ztrátu sloučenin během čištění. Slepý vzorek obohacený směsí různých kongenerů se podrobí čištění (alespoň n = 3) a výtěžnost a variabilita se ověří konfirmační metodou. Výtěžnost musí být v rozmezí 60 % až 120 %, zejména u kongenerů s podílem na množství TEQ v různých směsích, který je vyšší než 10 %.

7.1.6. Oznamovací mez

Při oznamování úrovní BEQ musí být stanovena oznamovací mez z příslušných matričních vzorků zahrnujících typická zastoupení kongenerů, avšak vzhledem k nízké preciznosti v dolním rozsahu křivky nikoli z kalibrační křivky standardů. Je třeba vzít v úvahu účinky extrakce a čištění. Oznamovací mez musí být stanovena tak, aby nejméně trojnásobně přesahovala hodnoty slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup.

7.2. *Použití referenčních vzorků*

7.2.1. Referenční vzorky musí představovat matrice vzorku, zastoupení kongenerů a rozsahy koncentrací pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem kolem maximálního limitu nebo akčního prahu.

7.2.2. Každá série zkoušek musí zahrnovat slepý vzorek odrážející celý pracovní postup, či nejlépe slepý matriční vzorek, a referenční vzorek na maximálním limitu nebo akčním prahu. Tyto vzorky musí být extrahovány a zkoušeny současně a za stejných podmínek. Referenční vzorek musí vykázat jasně vyšší odezvu v porovnání s odezvou slepého vzorku, čímž je zajištěna vhodnost zkoušky. Tyto vzorky mohou být použity pro korekci o hodnoty slepého stanovení a korekci na výtěžnost.

7.2.3. Referenční vzorky vybrané pro provedení korekce na výtěžnost musí být pro zkušební vzorky reprezentativní, což znamená, že zastoupení kongenerů nesmí vést k podhodnocení úrovní.

7.2.4. Pro prokázání odpovídající účinnosti zkoušky ve sledovaném rozsahu pro kontrolu maximálního limitu nebo akčního prahu lze kromě toho zahrnout ještě referenční vzorky o např. poloviční a dvojnásobné koncentraci, než je maximální limit nebo akční práh. Dohromady mohou být tyto vzorky použity pro výpočet úrovní BEQ ve zkušebních vzorcích (viz bod 7.1.2.2).

7.3. *Stanovení mezních hodnot*

Je nutné určit vztah mezi výsledky bioanalýzy v BEQ a výsledky konfirmační metody v TEQ (např. pomocí kalibračních pokusů, které zohledňují vliv matrice, s referenčními vzorky obohacenými na nule, polovině, jednonásobku a dvojnásobku maximálního limitu s šesti opakováními na každé úrovni (n = 24)). Na základě tohoto vztahu lze odhadnout korekční faktory (odečtení hodnoty slepého stanovení a korekce na výtěžnost), je však nutno je ověřit v souladu s bodem 7.2.2.

([12]) Současné požadavky vycházejí z TEF vydaných v: M. Van den Berg et al. Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

Je nutné stanovit mezní hodnoty pro účely rozhodnutí ohledně souladu vzorku s maximálními limity nebo pro kontrolu akčních prahů, jsou-li sledovanou hodnotou, a rovněž s příslušnými maximálními limity nebo akčními prahy, stanovenými buď zvlášť pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem, nebo pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem. Tyto hodnoty jsou zastoupeny *nižším*koncovým bodem distribuce výsledků bioanalýzy (upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) odpovídajícím rozhodovací mezi u příslušné konfirmační metody na základě 95 % míry spolehlivosti, z čehož vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků < 5 %, a na základě RSD_R < 25 %. Rozhodovací mezí u příslušné konfirmační metody je maximální limit při zohlednění rozšířené nejistoty měření.

Mezní hodnotu (v BEQ) lze vypočíst v souladu s jedním z postupů uvedených v bodech 7.3.1, 7.3.2 a 7.3.3 (viz graf 1).

7.3.1. S použitím *nižší* části 95 % predikčního intervalu na úrovni rozhodovací meze u příslušné konfirmační metody:

$$\text{Mezní hodnota} = BEQ_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2}\sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \overline{x})^2/Q_{xx}}$$

kde:

BEQ_{DL}	je BEQ odpovídající rozhodovací mezi u příslušné konfirmační metody, což je maximální limit při zohlednění rozšířené nejistoty měření
$s_{y,x}$	je reziduální směrodatná odchylka
$t_{\alpha,f = m-2}$	je kvantil Studentova t-rozdělení (α = 5 %, f = stupně volnosti, jednostranný)
m	je celkový počet kalibračních bodů (index j)
n	je počet opakování na každé úrovni
x_i	je koncentrace vzorku (v TEQ) v kalibračním bodě i stanovená konfirmační metodou
$\overline{x}$	je průměr koncentrací (v TEQ) všech kalibračních vzorků
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_1 - \overline{x})^2$	je parametr sumy čtverců, i = index pro kalibrační bod i

7.3.2. Výpočet z výsledků biologické zkoušky (upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) získaných z vícenásobných analýz vzorků (n ≥ 6) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze konfirmační metody, jakožto nižší část rozdělení výsledků na odpovídající průměrné hodnotě BEQ:

$$\text{Mezní hodnota} = BEQ_{DL} - 1,64 \times SD_R$$

kde:

SD_R	je směrodatná odchylka výsledků biologické zkoušky na BEQ_{DL}, měřeno za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti

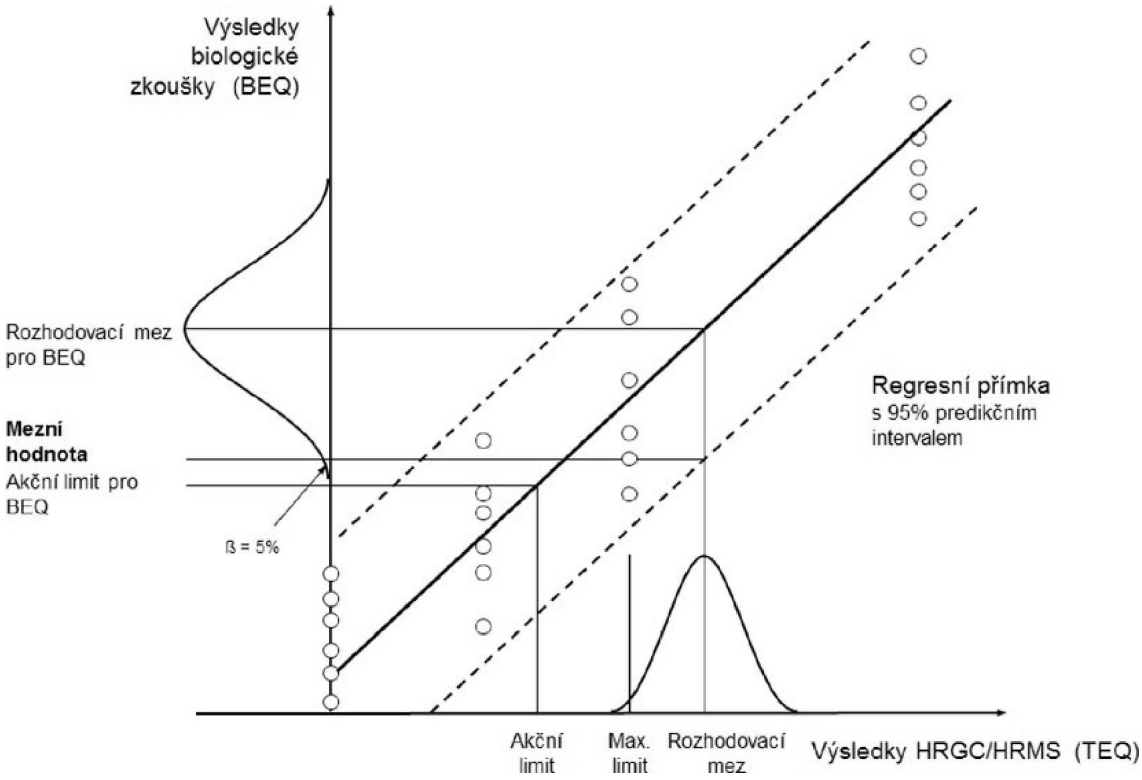
7.3.3. Výpočet jako střední hodnota výsledků bioanalýzy (v BEQ, upravených o hodnoty slepého stanovení a korigovaných na výtěžnost) z vícenásobné analýzy vzorků (n ≥ 6) kontaminovaných na 2/3 maximálního limitu nebo akčního prahu, na základě poznatku, že tato úroveň se bude pohybovat kolem mezní hodnoty určené v bodech 7.3.1 nebo 7.3.2:

Výpočet mezních hodnot vycházející z 95 % míry spolehlivosti, z níž vyplývá míra falešně vyhovujících výsledků < 5 %, a z RSD_R < 25 %:

1. z *nižší* části 95 % predikčního intervalu na úrovni rozhodovací meze u příslušné konfirmační metody;

2. z vícenásobné analýzy vzorků (n ≥ 6) kontaminovaných na úrovni rozhodovací meze u příslušné konfirmační metody jakožto *nižší*koncový bod distribuce údajů (v grafu je znázorňuje křivka ve tvaru zvonu) na odpovídající průměrné hodnotě BEQ.

Graf 1



7.3.4. Omezení mezních hodnot

Mezní hodnoty vycházející z BEQ a vypočtené z RSD_R dosažené při validaci s použitím omezeného počtu vzorků s různým zastoupením matrice/kongenerů mohou být vyšší než maximální limity nebo akční prahy vycházející z TEQ, vzhledem k větší preciznosti, než je preciznost, jíž lze běžně dosáhnout s neznámým spektrem zastoupení kongenerů. V takových případech se mezní hodnoty vypočtou z RSD_R = 25 % nebo se dá přednost dvěma třetinám maximálního limitu nebo akčního prahu.

7.4. *Charakteristiky účinnosti*

7.4.1. Vzhledem k tomu, že při bioanalytických metodách nelze použít žádné vnitřní standardy, provedou se zkoušky opakovatelnosti bioanalytických metod pro získání informací o směrodatné odchylce v rámci zkoušek a mezi sériemi zkoušek. Opakovatelnost musí být nižší než 20 %, vnitrolaboratorní reprodukovatelnost pak nižší než 25 %. To musí vycházet z vypočtených úrovní v BEQ po odečtení hodnot slepého stanovení a korekci na výtěžnost.

7.4.2. Jako součást postupu validace musí být prokázáno, že zkouška umožňuje rozlišit slepý vzorek a úroveň ve výši mezní hodnoty, a umožňuje tak identifikovat vzorky nad příslušnou mezní hodnotou (viz bod 7.1.2).

7.4.3. Je třeba určit cílové sloučeniny, možné interference a nejvyšší přípustný obsah ve slepém vzorku.

7.4.4. Procentní směrodatná odchylka odezvy nebo koncentrace vypočtená z odezvy (možné pouze v pracovním rozsahu) trojnásobného stanovení extraktu vzorku nesmí být vyšší než 15 %.

7.4.5. Pro hodnocení účinnosti bioanalytické metody v konstantním časovém období se použijí nekorigované výsledky referenčního vzorku (referenčních vzorků) vyjádřené v BEQ (pro slepý vzorek a maximální limit nebo akční práh).

7.4.6. Pro slepé vzorky odrážející celý pracovní postup a pro každý typ referenčního vzorku se zaznamenávají a ověřují grafy kontroly kvality, aby bylo zajištěno, že analytická účinnost je v souladu s příslušnými požadavky, u slepých vzorků odrážejících celý pracovní postup zejména s ohledem na požadovanou minimální odlišnost v nejspodnější části pracovního rozsahu a u referenčních vzorků zejména s ohledem na vnitrolaboratorní reprodukovatelnost. Slepé vzorky odrážející celý pracovní postup musí být důkladně kontrolovány, aby se zamezilo falešně vyhovujícím výsledkům po jejich odečtení.

7.4.7. Výsledky konfirmačních metod u podezřelých vzorků a 2 až 10 % vyhovujících vzorků (minimálně 20 vzorků na jednu matrici) se zaznamenají a použijí se pro hodnocení účinnosti screeningové metody a vztahu mezi BEQ a TEQ. Tuto databázi lze použít pro přehodnocení mezních hodnot platných pro běžné vzorky pro validované matrice.

7.4.8. Dobrou účinnost metody lze rovněž prokázat účastí v kruhových testech. Výsledky vzorků analyzovaných v kruhových testech, které pokrývají rozsah koncentrací až do např. dvojnásobku maximálního limitu, se rovněž mohou zahrnout do hodnocení podílu falešně vyhovujících výsledků, je-li laboratoř schopna prokázat svou dobrou výkonnost. Vzorky musí zahrnovat nejčastější zastoupení kongenerů, které představují různé zdroje.

7.4.9. Při incidentech lze mezní hodnoty přehodnotit, aby odrážely konkrétní matrici a zastoupení kongenerů tohoto konkrétního incidentu.

8. OZNAMOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

8.1. *Konfirmační metody*

8.1.1. Výsledky analýzy musí obsahovat hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem a hodnoty TEQ se oznámí jako dolní, horní a střední odhad, aby se do oznamování výsledků zahrnulo co nejvíce informací, a umožnila se tak interpretace výsledků podle příslušných zvláštních požadavků.

8.1.2. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

8.1.3. Pokud výtěžnost leží mimo rozmezí uvedené v bodě 6.2.5, je-li překročen maximální limit (v tomto případě výtěžnosti pro jednu ze dvou opakovaných analýz), a v ostatních případech na žádost, musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.

8.1.4. Protože se má při rozhodování o souladu vzorku přihlédnout také k rozšířené nejistotě měření, je třeba poskytnout i tento parametr. Výsledky analýzy se proto oznámí ve tvaru „x +/– U“, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije koeficient rozšíření 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %. V případě samostatného stanovení PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem se pro sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem musí použít suma odhadované rozšířené nejistoty měření samostatných výsledků analýzy pro PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

8.1.5. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a alespoň se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené ve směrnici 2002/32/ES.

8.2. *Bioanalytické screeningové metody*

8.2.1. Výsledek screeningu se vyjádří jako „vyhovující“ nebo „podezřelý jako nevyhovující“ („podezřelý“).

8.2.2. Kromě toho je možné vydat orientační výsledek pro PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem vyjádřený v BEQ, nikoli TEQ.

8.2.3. Vzorky s odezvou nižší než oznamovací mez se vyjádří jako „nižší než oznamovací mez“. Vzorky s odezvou vyšší než pracovní rozsah se oznámí jako „vzorky překračující pracovní rozsah“ a úroveň odpovídající horní části pracovního rozsahu se uvede v BEQ.

8.2.4. Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální limit nebo akční práh, z něhož hodnocení vychází.

8.2.5. Protokol musí uvádět použitý typ zkoušky, základní princip zkoušky a druh kalibrace.

8.2.6. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

8.2.7. V případě vzorků podezřelých jako nevyhovující musí protokol obsahovat poznámku o tom, jaká opatření mají být učiněna. Koncentraci PCDD/PCDF a sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.

8.2.8. Nevyhovující výsledky se oznámí pouze tehdy, pokud byly zjištěny konfirmační analýzou.

8.3. *Fyzikálně-chemické screeningové metody*

8.3.1. Výsledek screeningu se vyjádří jako „vyhovující“ nebo „podezřelý jako nevyhovující“ („podezřelý“).

8.3.2. Pro každý typ matrice vzorku musí protokol uvádět maximální limit nebo akční práh, z něhož hodnocení vychází.

8.3.3. Kromě toho mohou být hodnoty jednotlivých kongenerů PCDD/PCDF a/nebo PCB s dioxinovým efektem a hodnoty TEQ udávány jako dolní, horní a střední odhad. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a alespoň se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené ve směrnici 2002/32/ES.

8.3.4. Pokud výtěžnost leží mimo rozmezí uvedené v bodě 6.2.5, je-li překročen maximální limit (v tomto případě výtěžnosti pro jednu ze dvou opakovaných analýz), a v ostatních případech na žádost, musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.

8.3.5. V protokolu musí být uvedeno, která metoda GC-MS byla použita.

8.3.6. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem.

8.3.7. V případě vzorků podezřelých jako nevyhovující musí protokol obsahovat poznámku o tom, jaká opatření mají být učiněna. Koncentraci PCDD/PCDF a sumu PCDD/PCDF a PCB s dioxinovým efektem v těchto vzorcích se zvýšeným obsahem je třeba stanovit/potvrdit konfirmační metodou.

8.3.8. O tom, zda hodnota nebyla dodržena, může být rozhodnuto pouze konfirmační analýzou.

KAPITOLA III

PŘÍPRAVA VZORKŮ A POŽADAVKY NA METODY ANALÝZY POUŽÍVANÉ PŘI ÚŘEDNÍ KONTROLE OBSAHU PCB BEZ DIOXINOVÉHO EFEKTU V KRMIVECH

1. **Oblast použití**

Požadavky stanovené v této kapitole se použijí při analýze krmiv pro úřední kontrolu obsahu PCB bez dioxinového efektu a pro přípravu vzorků a analytické požadavky k jiným regulačním účelům, včetně kontrol prováděných provozovatelem krmivářského podniku k zajištění dodržování ustanovení nařízení (ES) č. 183/2005.

2. **Použitelné metody detekce**

Plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS nebo rovnocenné metody.

3. **Identifikace a konfirmace sledovaných analytů**

3.1. Relativní retenční čas ve vztahu k vnitřním standardům nebo referenčním standardům (s přijatelnou odchylkou ± 0,25 %).

3.2. Separace PCB bez dioxinového efektu plynovou chromatografií od rušivých látek, zejména současně se eluujících PCB, zvláště jsou-li úrovně vzorků v rozmezí limitů stanovených právními předpisy a případný nesoulad má být teprve potvrzen ([13]).

3.3. Požadavky na techniky GC-MS

Sledování alespoň následujícího počtu molekulárních iontů nebo charakteristických iontů z molekulárních klastrů:

a) dvou specifických iontů u HRMS;

b) tří specifických iontů u LRMS;

c) dvou specifických prekurzorových iontů, každý s jedním odpovídajícím specifickým přechodovým produktovým iontem pro MS-MS.

Nejvyšší přípustné tolerance intenzity vybraných hmotnostních fragmentů:

Relativní odchylka intenzity vybraných hmotnostních fragmentů od teoretické intenzity nebo kalibračního standardu pro cílový iont (nejintenzivnější sledovaný iont) a identifikační iont (ionty): ± 15 %

3.4. Požadavky na techniky GC-ECD

Konfirmace výsledků překračujících maximální limit s dvěma kolonami GC se stacionární fází jiné polarity.

4. **Prokazování účinnosti metody**

Účinnost metody se prokáže v rozsahu maximálního limitu (polovina až dvojnásobek maximálního limitu) s přijatelným variačním koeficientem pro opakovanou analýzu (viz požadavky na mezilehlou preciznost uvedené v bodě 9).

5. **Mez stanovitelnosti**

Suma mezí stanovitelnosti ([14]) PCB bez dioxinového efektu nesmí překročit jednu třetinu maximálního limitu ([15]).

6. **Kontrola kvality**

Pravidelné slepé kontrolní vzorky, analýzy obohacených vzorků, vzorky pro kontrolu kvality, účast v mezilaboratorních studiích o příslušných matricích.

7. **Kontrola výtěžnosti**

7.1. Použijí se vhodné vnitřní standardy s fyzikálně-chemickými vlastnostmi porovnatelnými se sledovanými analyty.

7.2. Přidání vnitřních standardů:

přidání k produktům (před extrakcí a čištěním).

7.3. Požadavky na metody, které využívají všech šesti kongenerů PCB bez dioxinového efektu značených izotopem

a) korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů;

b) výtěžnost vnitřních standardů značených izotopem musí být mezi 60 a 120 %;

c) nižší nebo vyšší výtěžnost jednotlivých kongenerů, která se na sumě PCB bez dioxinového efektu podílí méně než 10 %, je přijatelná.

([13]) Mezi kongenery, u nichž je často zjištěno, že se eluují současně, patří např. PCB 28/31, PCB 52/69 a PCB 138/163/164. U GC-MS je rovněž nutné vzít v úvahu možné interference z fragmentů vyšších chlorovaných kongenerů.

([14]) V příslušných případech je třeba se řídit zásadami popsanými v dokumentu „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].

([15]) Velmi se doporučuje, aby hodnoty slepého stanovení činidla byly nižší, než je obsah kontaminující látky ve vzorku. Je povinností laboratoře kontrolovat rozptyl hodnot slepých stanovení, zejména v případě, kdy se hodnoty slepého stanovení odečítají.

7.4. Požadavky na metody, které nevyužívají všech šesti vnitřních standardů značených izotopem nebo jiných vnitřních standardů:

a) kontrola výtěžnosti vnitřního standardu (vnitřních standardů) pro každý vzorek;

b) výtěžnost vnitřních standardů musí být mezi 60 a 120 %;

c) korekce výsledků na výtěžnost vnitřních standardů.

7.5. Výtěžnost neznačených kongenerů se ověří pomocí obohacených vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality s koncentracemi v rozsahu maximálního limitu. Výtěžnost těchto kongenerů se považuje za přijatelnou, pokud je mezi 60 a 120 %.

8. **Požadavky na laboratoře**

V souladu s ustanoveními nařízení (EU) 2017/625 musí být laboratoře akreditovány uznaným subjektem působícím v souladu s pokyny ISO/IEC Guide 58, aby bylo zaručeno, že uplatňují postupy zajištění analytické kvality. Laboratoře musí být akreditovány podle normy EN ISO/IEC 17025. Kromě toho je v příslušném případě třeba řídit se zásadami popsanými v technických pokynech pro odhad nejistoty měření a meze stanovitelnosti pro analýzu PCB ([16]).

9. **Charakteristiky účinnosti: kritéria pro sumu PCB bez dioxionového efektu při maximálním limitu**

	Hmotnostní spektrometrie s izotopovým zřeďováním (*)	Jiné techniky
Pravdivost	– 20 až + 20 %	– 30 až + 30 %
Mezilehlá preciznost (% RSD)	≤ 15 %	≤ 20 %
Rozdíl mezi výpočtem horního a dolního odhadu	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Jako vnitřní standardy musí být použito všech šest sloučenin značených izotopem ^{13}C.

10. **Oznamování výsledků**

10.1. Výsledky analýzy musí obsahovat hodnoty jednotlivých PCB bez dioxinového efektu a sumu těch kongenerů PCB oznamovaných jako dolní, horní a střední odhad, aby se do oznamování výsledků zahrnulo co nejvíce informací, a umožnila se tak interpretace výsledků podle příslušných zvláštních požadavků.

10.2. Protokol musí také zahrnovat metodu použitou pro extrakci PCB.

10.3. Pokud výtěžnost leží mimo rozmezí uvedené v bodě 7, je-li překročen maximální limit, a v ostatních případech na žádost, musí být dány k dispozici hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé vnitřní standardy.

10.4. Jelikož se má při rozhodování o souladu vzorku přihlédnout také k rozšířené nejistotě měření, je třeba poskytnout také tento parametr. Výsledky analýzy se proto oznámí ve tvaru „x +/– U“, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření, přičemž se použije koeficient rozšíření 2, který odpovídá míře spolehlivosti přibližně 95 %.

10.5. Výsledky se vyjádří ve stejných jednotkách a alespoň se stejným počtem platných číslic jako maximální limity stanovené ve směrnici 2002/32/ES.

([16]) Viz poznámka pod čarou 9.

B) NORMY EN

Pro použití čl. 34 odst. 2 písm. a) nařízení (EU) 2017/625 jsou relevantní tyto normy EN:

EN 17194 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení deoxynivalenolu, aflatoxinu B1, fumonisinu B1 a B2, T-2 a HT-2 toxinů, zearalenonu a ochratoxinu A v krmných surovinách a krmných směsích metodou LC-MS/MS

EN 17270 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení theobrominu v krmných surovinách a krmných směsích, včetně složek pocházejících z kakaa, metodou kapalinové chromatografie

EN 17504 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení gossypolu v semenech bavlníku a krmivech pomocí LC-MS/MS

EN 17362 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení pentachlorfenolu (PCP) v krmných surovinách a krmných směsích metodou LC-MS/MS

EN 16279 Krmiva – Stanovení obsahu fluoridů po extrakci kyselinou chlorovodíkovou metodou iontově selektivní elektrody (ISE)

EN 17053 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení stopových prvků, těžkých kovů a dalších prvků v krmivech metodou ICP-MS (multimetoda)

EN 15550 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení kadmia a olova po tlakovém rozkladu metodou atomové absorpční spektrometrie s grafitovou pískou (GF-AAS)

EN 16206 Krmiva – Stanovení arzenu metodou atomové absorpční spektrometrie s generováním hydridů (HGAAS) po mikrovlnném tlakovém rozkladu (rozklad pomocí 65 % kyseliny dusičné a 30 % peroxidu vodíku)

EN 16277 Krmiva – Stanovení rtuti atomovou absorpční spektrometrií metodou studených par (CVAAS) po mikrovlnném tlakovém rozkladu (extrakce s 65 % kyselinou dusičnou a 30 % peroxidem vodíku)

EN 16278 Krmiva – Stanovení anorganického arzenu atomovou absorpční spektrometrií s generováním hydridů (HG-AAS) po mikrovlnné extrakci a oddělení pomocí extrakce na pevné fázi (SPE)

EN 17374 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení anorganického arzenu v krmivu metodou anexové iontově výměnné HPLC-ICP-MS“

PŘÍLOHA VI

„PŘÍLOHA VII

METODA VÝPOČTU ENERGETICKÉ HODNOTY KRMIVA PRO DRŮBEŽ

1. Metoda výpočtu a vyjádření energetické hodnoty

Energetická hodnota krmné směsi pro drůbež se vypočte podle níže uvedeného vzorce na základě procentního podílu určitých analytických složek krmiva. Tato hodnota se vyjadřuje v megajoulech (MJ) metabolizovatelné energie (ME) s korekcí na dusík na jeden kilogram krmné směsi:

MJ/kg ME = 0,1551 × % hrubého proteinu + 0,3431 × % hrubého tuku + 0,1669 × % škrobu + 0,1301 × % celkového obsahu cukrů (vyjádřeného jako sacharóza).

2. Tolerance pro deklarované hodnoty

Jestliže úřední kontroly zjistí odchylku mezi výsledkem kontroly a deklarovanou energetickou hodnotou znamenající zvýšení nebo snížení energetické hodnoty krmiva, je přípustná tolerance 0,4 MJ/kg ME.

3. Vyjádření výsledku

Výsledek vypočtený podle výše uvedeného vzorce se uvádí s přesností na jedno desetinné místo.

4. Metody odběru vzorků a analýzy

Odběr vzorku krmné směsi a stanovení obsahu analytických složek uvedených v metodě výpočtu se provádí podle metod odběru vzorků a metod analýzy Unie pro úřední kontrolu krmiv.

Použije se:

— ke stanovení obsahu hrubého tuku: postup B metody pro stanovení obsahu hrubých olejů a tuků stanovené v příloze III části G,

— ke stanovení obsahu škrobu: polarimetrická metoda stanovená v příloze III části K.

METODA VÝPOČTU ENERGETICKÉ HODNOTY V KRMNÝCH SUROVINÁCH A KRMNÝCH SMĚSÍCH PRO KOČKY A PSY

Energetická hodnota v krmných surovinách a krmných směsích pro kočky a psy se vypočte v souladu s normou EN 16967 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Predikční rovnice pro výpočet metabolizovatelné energie v krmných surovinách a krmných směsích (krmiva pro zvířata v zájmovém chovu) pro kočky a psy včetně dietních krmiv.“