



2024/771

15.3.2024

IZVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2024/771

z dne 29. februarja 2024

o spremembi Uredbe (ES) št. 152/2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (EU) 2017/625 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 15. marca 2017 o izvajanju uradnega nadzora in drugih uradnih dejavnosti, da se zagotovi uporaba zakonodaje o živilih in krmu, pravil o zdravju in dobrobiti živali ter zdravju rastlin in fitofarmaceutskih sredstvih, ter o spremembi uredb (ES) št. 999/2001, (ES) št. 396/2005, (ES) št. 1069/2009, (ES) št. 1107/2009, (EU) št. 1151/2012, (EU) št. 652/2014, (EU) 2016/429 in (EU) 2016/2031 Evropskega parlamenta in Sveta, uredb Sveta (ES) št. 1/2005 in (ES) št. 1099/2009 ter direktiv Sveta 98/58/ES, 1999/74/ES, 2007/43/ES, 2008/119/ES in 2008/120/ES ter razveljavitvi uredb (ES) št. 854/2004 in (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta, direktiv Sveta 89/608/EGS, 89/662/EGS, 90/425/EGS, 91/496/EGS, 96/23/ES, 96/93/ES in 97/78/ES ter sklepa Sveta 92/438/EGS (Uredba o uradnem nadzoru) ⁽¹⁾ in zlasti člena 34(6) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 ⁽²⁾ določa metode vzorčenja in analitske metode za uradni nadzor krme.
- (2) Metode vzorčenja in analizne metode, določene z Uredbo (ES) št. 152/2009, bi bilo treba prilagoditi znanstvenemu in tehnološkemu razvoju. S to uredbo bi bilo treba uvesti več manjših sprememb, pri čemer bi bilo treba upoštevati izkušnje z uporabo analizne metode ali pojasniti nekatere določbe.
- (3) Metoda vzorčenja, opisana v Uredbi (ES) št. 152/2009, ni primerna za vzorčenje za nadzor nad mikrobiološko kontaminacijo in je zato izključena iz področja uporabe. Ker pa po spremembi z Uredbo Komisije (EU) št. 691/2013 ⁽³⁾ ni več izrecno izključena iz področja uporabe, je to povzročilo nekaj zmede, zato je primerno, da se ponovno izrecno izključi iz področja uporabe.
- (4) Primerno je uvesti posebne določbe za vzorčenje krme, ki jo nosilci dejavnosti poslovanja s krmo ponujajo za prodajo prek sredstev za komuniciranje na daljavo, glede na to, da se prodaja krme prek sredstev za komuniciranje na daljavo povečuje. Poleg določb o analizni merilni negotovosti in izkoristku v primeru analize nezaželenih snovi bi bilo treba take določbe uvesti tudi za analizo vsebnosti krmnih dodatkov, saj so navedene določbe pomembne tudi v tem primeru. Glede na dokaze, da uporaba analizne metode za določanje sečnine zunaj področja uporabe dovoljenja za sečnino kot krmni dodatek prinaša nepravilne rezultate analiz, bi bilo treba opredeliti področje uporabe navedene metode in dodati informacije o oceni metode in rezultatov sodelovalne študije.
- (5) Več analiznih metod, določenih z Uredbo (ES) št. 152/2009, bi bilo treba črtati, saj ne veljajo več za predvideni namen. Analizno metodo za določanje hlapnih dušikovih baz in metodo za določanje karbonatov bi bilo treba črtati, ker v zakonodaji Unije o krmi ni več pravne zahteve za nadzor skladnosti. Obstoječa analizna metoda za določanje diklazurila vsebuje redakcijske napake in posledično ne zagotavlja zanesljivih rezultatov analize. Zato bi jo bilo treba nadomestiti s prilagojeno metodo, za katero se je izkazalo, da zagotavlja zanesljive rezultate. Nove metode za analizo prostega in celotnega gosipola so zagotovile dokaze, da analizna metoda za določanje prostega in

⁽¹⁾ UL L 95, 7.4.2017, str. 1.

⁽²⁾ Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 z dne 27. januarja 2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme (UL L 54, 26.2.2009, str. 1).

⁽³⁾ Uredba Komisije (EU) št. 691/2013 z dne 19. julija 2013 o spremembi Uredbe (ES) št. 152/2009 glede metod vzorčenja in analitskih metod (UL L 197, 20.7.2013, str. 1).

celotnega gosipola, določena z Uredbo (ES) št. 152/2009, ne zagotavlja zanesljivih rezultatov, zato bi jo bilo treba črtati in nadomestiti s sklicevanjem na evropske standarde (standardi EN). Analizne metode za nadzor nezakonite prisotnosti dodatkov, ki niso več dovoljeni v krmi, bi bilo treba črtati, saj so bili od takrat razviti bolj občutljivi presejalni pristopi in analizne metode.

- (6) Poleg analiznih metod, opisanih v prilogah k tej uredbi, bi se bilo treba sklicevati na standarde EN za uporabo pri uradnem nadzoru.
- (7) Ker je bil z Izvedbeno uredbo Komisije (EU) 2021/2047 (*) odobren nov krmni dodatek amprolij, bi bilo treba v Prilogo IV k Uredbi (ES) št. 152/2009 dodati analizno metodo za določanje amprolija.
- (8) Ker so spremembe Uredbe (ES) št. 152/2009 bistvene in se nanašajo na več določb v prilogah k Uredbi, je zaradi jasnosti primerno, da se navedene priloge v celoti nadomestijo.
- (9) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za rastline, živali, hrano in krmo –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Spremembe Uredbe (ES) št. 152/2009

Uredba (ES) št. 152/2009 se spremeni:

- (1) Prvi odstavek člena 1 se nadomesti z naslednjim:

„Vzorčenje za uradni nadzor krme, zlasti v zvezi z določanjem sestavin, vključno s snovmi, ki vsebujejo, sestojijo iz ali so proizvedene iz gensko spremenjenih organizmov (GSO), krmnih dodatkov, kakor so opredeljeni v Uredbi (ES) št. 1831/2003 Evropskega parlamenta in Sveta (*), in nezaželenih snovi, kakor so opredeljene v Direktivi 2002/32/ES Evropskega Parlamenta in Sveta (**), se izvaja v skladu z metodami iz Priloge I z izjemo vzorčenja za nadzor nad mikrobiološko kontaminacijo.

(*) Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali (UL L 268, 18.10.2003, str. 29).

(**) Direktiva 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 7. maja 2002 o nezaželenih snoveh v živalski krmi (UL L 140, 30.5.2002, str. 10).“.

- (2) Priloga I se nadomesti z besedilom iz Priloge I k tej uredbi.
- (3) Priloga II se nadomesti z besedilom iz Priloge II k tej uredbi.
- (4) Priloga III se nadomesti z besedilom iz Priloge III k tej uredbi.
- (5) Priloga IV se nadomesti z besedilom iz Priloge IV k tej uredbi.
- (6) Priloga V se nadomesti z besedilom iz Priloge V k tej uredbi.
- (7) Priloga VII se nadomesti z besedilom iz Priloge VI k tej uredbi.
- (8) Priloga VIII se črta.

(*) Izvedbena uredba Komisije (EU) 2021/2047 z dne 23. novembra 2021 o dovoljenju za amprolov hidroklorid (COXAM) kot krmni dodatek za pitovne piščance in piščance za nesnice (imetnik dovoljenja: HuvePharma NV) (UL L 418, 24.11.2021, str. 13).

Člen 2

Začetek veljavnosti

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 29. februarja 2024

Za Komisijo
predsednica
Ursula VON DER LEYEN

PRILOGA I

„PRILOGA I

METODE VZORČENJA

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Vzorci za uradni nadzor krme se jemljejo v skladu s spodaj opisanimi metodami. Tako dobljeni vzorci se obravnavajo kot reprezentativni za vzorčene deleže.

Namen reprezentativnega vzorčenja je pridobiti majhen delež iz lota, pri čemer opredelitev katere koli značilnosti tega deleža pomeni srednjo vrednost značilnosti lota. Lot se vzorči tako, da se večkrat odvzamejo posamični vzorci na različnih mestih v lotu. Posamični vzorci se z mešanjem združijo v zbirni vzorec, iz katerega se pripravijo reprezentativni končni vzorci z reprezentativno delitvijo.

Če se na podlagi vizualnega pregleda deležev krme za vzorčenje ali na podlagi drugih ustreznih informacij ugotovi, da se ti po kakovosti razlikujejo od preostale krme iz istega lota, se taki deleži ločijo od preostale krme in obravnavajo kot ločeni subplot. Če krme ni mogoče razdeliti v ločene subplot, se vzorči kot en lot. V takih primerih je to treba navesti v zapisniku o vzorčenju.

Kadar se ugotovi, da krma, ki je vzorčena v skladu z določbami te uredbe, ne izpolnjuje zahtev EU in je del lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

Vzorčenje lahko vključuje krmo, ki jo nosilci dejavnosti poslovanja s krmo ponujajo za prodajo prek sredstev za komuniciranje na daljavo v skladu s členom 11(3) Uredbe (ES) št. 767/2009 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾. Za vzorčenje krme, ponujene za prodajo prek sredstev za komuniciranje na daljavo, se načeloma uporabljajo točke iz te priloge. Posebni vidiki vzorčenja vzorcev pri prodaji na daljavo so opisani v točki 11.

2. OPREDELITEV POJMOV

- Lot (ali serija): določena količina krme s skupnimi značilnostmi, kot so izvor, sorta, vrsta pakiranja, izvajalec pakiranja, pošiljatelj ali označevanje, in v primeru proizvodnega postopka enota proizvodnje iz posameznega obrata, pri kateri so uporabljeni enotni proizvodni parametri, ali več takšnih enot, kadar se proizvedejo v zaporednem vrstnem redu in se skupaj skladiščijo.
- Vzorčeni delež: lot ali opredeljeni del lota oziroma subplota.
- Zapečateni vzorec: vzorec, ki je zapečaten na način, ki preprečuje kakršen koli dostop do vzorca, pri katerem se pečat ne bi zlomil ali odstranil.
- Posamični vzorec: količina, ki se vzame iz ene točke vzorčenega deleža.
- Zbirni vzorec: skupek posamičnih vzorcev, vzetih iz istega vzorčenega deleža.
- Zmanjšani vzorec: del zbirnega vzorca, pridobljen z reprezentativnim zmanjšanjem istega vzorca.
- Končni vzorec: del zbirnega vzorca (mešan), zmanjšanega vzorca ali homogeniziranega zbirnega vzorca, odvisno od vrste nadzora (glej točko 9.4).
- Laboratorijski vzorec: vzorec, namenjen za laboratorij (kakor ga sprejme laboratorij), in je lahko končni vzorec, zmanjšani vzorec oziroma zbirni vzorec.
- Vzorec pri prodaji na daljavo: Vzorec lota ali serije krme, ponujene za prodajo prek sredstev za komuniciranje na daljavo.

⁽¹⁾ Uredba (ES) št. 767/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 13. julija 2009 o dajanju krme v promet in njeni uporabi, spremembi Uredbe (ES) št. 1831/2003 Evropskega parlamenta in Sveta in razveljavitvi Direktive Sveta 79/373/EGS, Direktive Komisije 80/511/EGS, direktiv Sveta 82/471/EGS, 83/228/EGS, 93/74/EGS, 93/113/ES in 96/25/ES ter Odločbe Komisije 2004/217/ES (UL L 229, 1.9.2009, str. 1).

3. SPLOŠNE DOLOČBE

- Vzorce jemljejo osebe, ki jih za ta namen pooblasti pristojni organ.
- Pristojni organ prek sredstev za komuniciranje na daljavo od nosilca dejavnosti poslovanja s krmo zaprosi količino krme za vzorce pri prodaji na daljavo.
- Vzorec mora biti zapečaten tako, da se vanj ne more poseči, ne da bi se pri tem zlomil ali odstranil pečat.

Oznaka na pečatu mora biti jasno razpoznavna in vidna.
- Identifikacija vzorca: vzorec mora biti neizbrisno označen in identificiran tako, da je nedvoumno povezan z zapisnikom o vzorčenju.
- Iz vsakega zbirnega vzorca ali zmanjšanega vzorca se odvzamejo naslednji končni vzorci: odvzeti se morata en vzorec za nadzor (uradni nadzor) in en za nosilca dejavnosti poslovanja s krmo (dopolnilno izvedensko mnenje). Lahko se odvzame tudi en dodatni končni vzorec za referenčne namene. Če je ves zbirni vzorec homogeniziran, se končni vzorci odvzamejo iz homogeniziranega zbirnega vzorca, razen če je tak postopek v nasprotju s pravili držav članic o pravicah nosilca dejavnosti poslovanja s krmo.
- Kadar je to potrebno za izvajanje uradnega vzorčenja in kadar tako zahtevajo pristojni organi, nosilci dejavnosti poslovanja s krmo v skladu s členom 15, odstavek 1 in 2, Uredbe (EU) 2017/625:
 - osebju pristojnih organov zagotovijo dostop do opreme pod njihovim nadzorom, po potrebi vključno z dajanjem na voljo ustrezne opreme za vzorčenje in osebne zaščitne opreme,
 - pomagajo in sodelujejo z osebjem pristojnih organov, da omogočijo vzorčenje, vključno z dostopom osebja pristojnih organov do krme.

4. NAPRAVA

- 4.1 Naprava za vzorčenje mora biti izdelana iz snovi, ki ne morejo onesnažiti proizvodov, ki se vzorčijo. Naprava, ki je namenjena večkratni uporabi, mora biti preprosta za čiščenje, da se prepreči navzkrižno onesnaženje.

4.2 Priporočena naprava za vzorčenje trdne krme.

4.2.1 Ročno vzorčenje

- 4.2.1.1 Lopatka za vzorčenje z ravnim dnom in navpičnimi stranicami.

- 4.2.1.2 Sonda za vzorčenje z dolgo rezo ali razdelki. Dimenzije sonde za vzorčenje morajo ustrezati značilnostim vzorčenega deleža (globina posode, velikost vreče itd.) in velikosti delcev krme.

Če ima sonda za vzorčenje več rež, morajo biti te ločene z razdelki ali zaporedno razporejenimi odprtini, da se zagotovi, da se vzorec odvzame na različnih mestih sonde.

4.2.2 Mehansko vzorčenje

Za vzorčenje premikajoče se krme se lahko uporablja ustrezna mehanska naprava. Mehanska naprava se šteje za ustrezno, kadar se vzorči vsaj celotni del pretoka.

Vzorčenje premikajoče se krme (pri visokih hitrostih pretoka) se lahko opravi z avtomatskimi napravami za vzorčenje.

4.2.3 Razdelilnik

Če je to mogoče in primerno, se mora naprava, namenjena za delitev vzorca na približno enake dele, uporabiti za pripravo reprezentativnih zmanjšanih vzorcev.

5. KOLIČINSKE ZAHTEVE GLEDE ŠTEVILA POSAMIČNIH VZORCEV

- Količinske zahteve v točkah 5.1 in 5.2 glede števila posamičnih vzorcev se uporabljajo za velikosti vzorčenih deležev do največ 500 ton, ki se lahko reprezentativno vzorčijo. Opisani postopek vzorčenja velja tudi za količine, večje od predpisane največje velikosti vzorčenega deleža, če se ne upošteva največje število posamičnih vzorcev, navedeno v naslednjih tabelah v točkah 5.1.1, 5.1.3 in 5.1.5, pri čemer se število posamičnih vzorcev določi s formulo kvadratnega korena, navedeno v ustreznem delu postopka (glej točko 5.3), najmanjša velikost zbirnega vzorca pa se sorazmerno poveča. To ne onemogoča delitve večjega lota v manjše sublote, pri čemer se vsak subplot vzorči v skladu s postopkom iz točk 5.1 in 5.2.
- Velikost vzorčenega deleža mora biti takšna, da se lahko vzorči vsak njegov sestavni del.
- Za zelo velike lote ali sublote (> 500 ton) in za lote, ki se prevažajo ali skladiščijo tako, da ni mogoče opraviti vzorčenja v skladu s postopkom vzorčenja iz točk 5.1 in 5.2 te točke, se uporabi postopek vzorčenja iz točke 5.3.
- Za vzorce pri prodaji na daljavo pristojni organ običajno ni seznanjen z velikostjo lota, iz katerega se zahteva količina. Zato se postopek iz točk 5.1 in 5.2 ne more uporabljati. V tem primeru se uporabi postopek, opisan v točki 11.
- Če zakonodaja določa, da mora nosilec dejavnosti poslovanja s krmo ravnati v skladu s to uredbo v okviru obveznega sistema spremljanja, lahko nosilec dejavnosti poslovanja s krmo zaradi upoštevanja operativnih značilnosti odstopa od količinskih zahtev iz te točke, pod pogojem, da pristojnemu organu predloži dokaz o enakovrednosti postopka vzorčenja, s katerim se pristojni organ strinja.
- V izjemnih primerih, če ni mogoče izvesti metode vzorčenja z opredeljenimi količinskimi zahtevami zaradi nesprejemljive komercialne škode lota (zaradi oblik pakiranja, prevoznih sredstev, načina skladiščenja itd.), se lahko uporabi alternativna metoda vzorčenja, če je čim bolj reprezentativna ter v celoti opisana in dokumentirana.

5.1 Količinske zahteve glede posamičnih vzorcev pri nadzoru snovi ali proizvodov, ki so enakomerno porazdeljeni po krmi

5.1.1 Razsuta trdna krma

Velikost vzorčenega deleža	Najmanjše število posamičnih vzorcev
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	$\sqrt{\text{ (20-kratnik mase v tonah vzorčenega deleža) (*) }}$, do največ 40 posamičnih vzorcev

(*) Kadar dobljeno število ni celo število, se zaokroži navzgor na naslednje celo število.

5.1.2 Razsuta tekoča krma

Velikost vzorčenega deleža	Najmanjše število posamičnih vzorcev
≤ 2,5 tone ali ≤ 2 500 litrov	4 (*)
> 2,5 tone ali > 2 500 litrov	7 (*)

(*) Če tekočine ni mogoče homogenizirati, je treba povečati število posamičnih vzorcev.

5.1.3 *Pakirana krma*

Krma (trdna in tekoča) je lahko pakirana v torbe, vreče, pločevinke, sode itd., ki so v naslednji tabeli navedeni kot enote. Velike enote (≥ 500 kg ali l) je treba vzorčiti v skladu z določbami za razsuto krmo (glej točki 5.1.1 in 5.1.2).

Velikost vzorčenega deleža	Najmanjše število enot, iz katerih je treba vzeti (vsaj) en posamični vzorec (*)
1 do 20 enot	1 enota (**)
21 do 150 enot	3 enote (**)
151 do 400 enot	5 enot (**)
> 400 enot	$\frac{1}{4} \sqrt{\text{(število enot vzorčenega deleža)}}^{***}$, do 40 enot

(*) Kadar bi lahko odprtje enote vplivalo na analizo (na primer pokvarljiva mokra krma), se kot posamični vzorec vzame neodprta enota.

(**) Pri enotah, katerih vsebina ne presega 1 kg oziroma 1 l, je vsebina posamičnega vzorca ena izvirna enota.

(***) Kadar dobljeno število ni celo število, se zaokroži navzgor na naslednje celo število.

5.1.4 *Krmni bloki in mineralni lizalni kamni*

Vzorči se najmanj en blok ali lizalni kamen na vzorčni delež s 25 enotami, do največ štirih blokov ali lizalnih kamnov.

Pri blokih ali lizalnih kamnih, ki posamično ne tehtajo več kot 1 kg, je vsebina posamičnega vzorca en blok ali en kamen.

5.1.5 *Voluminozna krma/sveža krma*

Velikost vzorčenega deleža	Najmanjše število posamičnih vzorcev (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	$\sqrt{5 \cdot \text{(5-kratnik mase v tonah vzorčenega deleža)}}^{**}$, do največ 40 posamičnih vzorcev

(*) Ugotovljeno je, da v nekaterih okoliščinah (na primer silaža) ni mogoče vzeti zahtevanih posamičnih vzorcev, ne da bi pri tem nesprejemljivo poškodovali lot. V takih primerih se lahko uporabi alternativna metoda vzorčenja in za vzorčenje takih lotov so pripravljene smernice, ki so na voljo na https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

(**) Kadar dobljeno število ni celo število, se zaokroži navzgor na naslednje celo število.

5.2 **Količinske zahteve glede posamičnih vzorcev pri nadzoru sestavin ali snovi, za katere obstaja verjetnost, da so neenakomerno porazdeljene po krmi**

Te količinske zahteve glede posamičnih vzorcev se morajo uporabljati v naslednjih okoliščinah:

- nadzor nad aflatoksini, rženimi rožički, drugimi mikotoksini in škodljivimi botaničnimi nečistočami v posamičnih krmilih,
- nadzor nad navzkrižnim onesnaženjem s sestavino, vključno z gensko spremenjenimi snovmi, ali snovjo, za katero obstaja verjetnost, da je neenakomerno porazdeljena po krmi.

Če nadzorni organ utemeljeno sumi, da velja taka neenakomerna porazdelitev tudi v primeru navzkrižnega onesnaženja s sestavino ali snovjo v krmni mešanici, se lahko uporabijo količinske zahteve iz naslednje tabele.

Velikost vzorčenega deleža	Najmanjše število posamičnih vzorcev
< 80 ton	Glej količinske zahteve iz točke 5.1. Število posamičnih vzorcev, ki jih je treba vzeti, je treba pomnožiti z 2,5.
≥ 80 ton	100

5.3 Količinske zahteve glede posamičnih vzorcev v primeru zelo velikih lotov

V primeru velikih vzorčenih deležev (vzorčeni deleži > 500 ton) je treba vzeti 40 posamičnih vzorcev + $\sqrt{\text{ton}}$ pri nadzoru snovi ali proizvodov, ki so enakomerno porazdeljeni po krmi, ali 100 posamičnih vzorcev + $\sqrt{\text{ton}}$ pri nadzoru sestavin ali snovi, za katere obstaja verjetnost, da so neenakomerno porazdeljene po krmi.

6. KOLIČINSKE ZAHTEVE GLEDE ZBIRNEGA VZORCA

Zahteva se en zbirni vzorec na vzorčeni delež.

	Vrsta krme	Najmanjša velikost zbirnega vzorca (*) (**)
6.1	Razsuta krma:	4 kg
6.2	Pakirana krma:	4 kg (***)
6.3	Tekoča ali poltekoča krma:	4 litri
6.4	Krmni bloki ali mineralni lizalni kamni:	
6.4.1	mase več kot 1 kg po kosu	4 kg
6.4.2	mase največ 1 kg po kosu	masa štirih izvirnih blokov ali lizalnih kamnov
6.5	Voluminozna krma/sveža krma:	4 kg (****)

(*) Če je vzorčena krma velike vrednosti, se lahko odvzame manjša količina zbirnega vzorca, pri čemer se to opiše in dokumentira v zapisniku o vzorčenju.

(**) V skladu z določbami Uredbe Komisije (EU) št. 619/2011 z dne 24. junija 2011 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme glede prisotnosti gensko spremenjene snovi, za katero je bil začel postopek odobritve ali je odobritev zanj potekla (UL L 166, 25.6.2011, str. 9), mora zbirni vzorec za nadzor glede prisotnosti gensko spremenjene snovi vsebovati vsaj 35 000 semen/zrn. To pomeni, da mora biti velikost zbirnega vzorca pri koruzi vsaj 10,5 kg, pri soji pa vsaj 7 kg. Pri drugih semenih in zrnih, kot so ječmen, proso, oves, riž, rž, pšenica in seme oljne ogrščice, velikost zbirnega vzorca 4 kg ustreza več kot 35 000 semen/zrn.

(***) Pri pakirani krmi včasih prav tako ni mogoče doseči velikosti zbirnega vzorca 4 kg, kar je odvisno od velikosti posamične enote.

(****) Pri voluminozni krmi/sveži krmi z majhno specifično gostoto (npr. seno, slama) mora biti najmanjša velikost zbirnega vzorca 1 kg.

7. KOLIČINSKE ZAHTEVE GLEDE KONČNIH VZORCEV

Končni vzorci

Zahteva se analiza vsaj enega končnega vzorca. Količina končnega vzorca za analizo ne sme biti manjša od:

Trdna krma	500 g (*) (**) (***) (****)
Tekoča ali poltekoča krma	500 ml (*)
(*) V skladu z določbami Uredbe (EU) št. 619/2011 mora končni vzorec za nadzor glede prisotnosti gensko spremenjene snovi vsebovati najmanj 10 000 semen/zrn. To pomeni, da mora biti velikost končnega vzorca pri koruzi vsaj 3 000 g, pri soji pa vsaj 2 000 g. Pri drugih semenih in zrnih, kot so ječmen, proso, oves, riž, rž, pšenica in seme oljne ogrščice, velikost končnega vzorca 500 g ustreza več kot 10 000 semen. (**) Če je velikost zbirnega vzorca precej manjša od 4 kg oziroma litrov (glej opombe pod točko 6), se lahko odvzame tudi manjša količina končnega vzorca, pod pogojem, da je to opisano in dokumentirano v zapisniku o vzorčenju. (***) Pri vzorčenju stročnic, žitnih zrn in lupinarjev za ugotavljanje ostankov pesticidov je najmanjša velikost končnega vzorca 1 kg v skladu z določbami Direktiva Komisije 2002/63/ES z dne 11. julija 2002 o določitvi metod vzorčenja za uraden nadzor nad ostanki pesticidov v in na proizvodih rastlinskega in živalskega izvora v Skupnosti in o razveljavitvi Direktive 79/700/EGS (UL L 187, 16.7.2002, str. 30). (****) V primeru vizualnega pregleda ali mikroskopije je količina končnega vzorca za pregled 1 kg.	

8. METODA VZORČENJA ZA ZELO VELIKE LOTE ALI LOTE, KI SE SKLADIŠČIJO ALI PREVAŽAJO TAKO, DA NI MOGOČE VZORČENJE PO CELOTNEM LOTU

8.1 Splošna načela

Če način prevoza ali skladiščenja lota ne omogoča odvzema posamičnih vzorcev po celotnem lotu, se vzorčenje takih lotov po možnosti opravi ob pretoku lota.

V primeru velikih skladišč, namenjenih skladiščenju krme, je treba nosilce dejavnosti spodbujati, da v skladišče vgradijo opremo, ki omogoča (avtomatsko) vzorčenje celotnega skladiščenega lota.

Če se uporabljajo postopki vzorčenja, določeni v tej točki, se nosilec dejavnosti poslovanja s krmo obvesti o postopku vzorčenja. Če nosilec dejavnosti poslovanja s krmo ali njegov predstavnik izrazi dvom o postopku vzorčenja, pristojnemu organu omogoči, da na njegove stroške vzorči celotni lot.

8.2 Veliki loti, ki se prevažajo z ladjo

8.2.1 Dinamično vzorčenje velikih lotov, ki se prevažajo z ladjo

Vzorčenje velikih lotov na ladjah se po možnosti izvaja med samim pretokom proizvoda (dinamično vzorčenje).

Vzorčenje se izvaja po posamičnih ladijskih skladiščih (fizično ločenih enotah). Ladijska skladišča se sicer praznijo drugo za drugo tako, da po prenosu v skladiščne prostore prvotne fizične ločitve ni več. Vzorčenje se zato lahko izvede glede na začetno fizično ločitev ali glede na ločitev po izvedenem prenosu v skladiščne prostore.

Raztovarjanje ladje lahko traja več dni. Običajno je treba vzorčenje izvesti v rednih presledkih med celotnim trajanjem raztovarjanja. Vendar ni vedno mogoče ali primerno, da je uradni inšpektor prisoten za vzorčenje med celotnim trajanjem raztovarjanja. Zato je dovoljeno vzorčenje za del (vzorčeni delež) celotnega lota. Število posamičnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža.

V primeru vzorčenja dela lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, za katerega je ugotovljeno, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

Inšpektor mora biti prisoten tudi, če se uradni vzorec odvzame avtomatsko. Pri avtomatskem vzorčenju s prednastavljenimi parametri, ki jih ni mogoče spremeniti med vzorčenjem, in če se posamični vzorci zbirajo v zapečateni zbiralni posodi, da se preprečijo morebitne goljufije, mora biti inšpektor prisoten le na začetku vzorčenja, vsakokrat, ko je treba zamenjati posodo za zbiranje vzorcev, in na koncu vzorčenja.

8.2.2 *Statično vzorčenje lotov, ki se prevažajo z ladjo*

Če se izvaja statično vzorčenje, je treba uporabiti enak postopek, kot je določen za skladiščne prostore (silose), ki so dostopni od zgoraj (glej točko 8.4.1).

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu (od zgoraj) lota/ladijskega skladišča. Število posamičnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža. V primeru vzorčenja dela lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, za katerega je ugotovljeno, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

8.3 **Vzorčenje velikih lotov, ki se skladiščijo v skladiščih**

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu lota. Število posamičnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža. V primeru vzorčenja dela lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, za katerega je ugotovljeno, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

8.4 **Vzorčenje skladiščnih prostorov (silosov)**

8.4.1 *Vzorčenje silosov, (zlahka) dostopnih od zgoraj*

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu lota. Število posamičnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža. V primeru vzorčenja dela lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, za katerega je ugotovljeno, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

8.4.2 *Vzorčenje silosov, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi)*

8.4.2.1 Silosi, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi), velikosti > 100 ton

Krme, ki se skladišči v takih silosih, ni mogoče statično vzorčiti. Če je treba krmo v silosu vzorčiti in pošiljke ni mogoče premakniti, se je treba z nosilcem dejavnosti dogovoriti, da inšpektorja obvesti, kdaj se bo silos raztovoril, da se omogoči vzorčenje med pretokom krme.

8.4.2.2 Silosi, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi), velikosti < 100 ton

Postopek vzorčenja vključuje prenos od 50 kg do 100 kg krme v zbiralno posodo in odvzem vzorca iz nje. Velikost zbirnega vzorca ustreza celotnemu lotu, število posamičnih vzorcev pa je povezano s količino iz silosa, preneseno v zbiralno posodo za vzorčenje. V primeru vzorčenja dela lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom, za katerega je ugotovljeno, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.

8.5 **Vzorčenje razsute krme v velikih zaprtih zabojnikih**

Taki loti se pogosto lahko vzorčijo šele ob raztovarjanju. V nekaterih primerih ni mogoče opraviti raztovarjanja na točki uvoza ali kontrolni točki, zato se mora vzorčenje izvesti ob raztovarjanju takih zabojnikov.

9. NAVODILA ZA JEMANJE, PRIPRAVO IN PAKIRANJE VZORCEV

9.1 **Splošno**

Vzorci se morajo jemati in pripravljati brez nepotrebnega odlašanja, pri tem pa se morajo upoštevati vsi potrebni previdnostni ukrepi za preprečitev spremembe ali onesaženja proizvoda. Instrumenti ter površine in zabojniki, namenjeni za sprejem vzorcev, morajo biti čisti in suhi.

9.2 Posamični vzorci

Posamične vzorce je treba vzeti naključno in enakomerno porazdeljeno iz celotnega vzorčenega deleža ter morajo biti približno enako veliki.

Velikost posamičnega vzorca je najmanj 100 g oziroma 25 g v primeru voluminozne krme/sveže krme z majhno specifično gostoto.

Če je treba v skladu s pravili za postopek vzorčenja iz točke 8 vzeti manj kot 40 posamičnih vzorcev, se velikost posamičnih vzorcev določi glede na zahtevano velikost zbirnega vzorca (glej točko 6).

Če se vzorčijo majhni loti pakirane krme, pri katerih je treba v skladu s količinskimi zahtevami vzeti omejeno število posamičnih vzorcev, je vsebina posamičnega vzorca ena izvirna enota, ki ne presega 1 kg ali 1 litra.

Če se vzorči pakirana krma, ki je sestavljena iz majhnih enot (npr. < 250 g), je velikost posamičnega vzorca odvisna od velikosti enote.

V primeru vzorcev pri prodaji na daljavo je velikost posamičnega vzorca odvisna od velikosti enote in lahko vsebuje manj kot 100 g ali 100 ml v posameznih primerih.

9.2.1 Razsuta krma

Kadar je ustrezno, se lahko vzorčenje opravi med premikanjem (natovarjanjem ali raztovarjanjem) vzorčenega deleža.

9.2.2 Pakirana krma

Po izbiri zahtevanega števila enot za vzorčenje, kot je navedeno v točki 5, se del vsebine vsake enote odstrani s sondo ali lopatko. Po potrebi se enote izpraznijo ločeno in šele nato odvzamejo vzorci.

9.2.3 Homogenizirana ali za homogeniziranje primerna tekoča ali poltekoča krma

Po izbiri zahtevanega števila enot za vzorčenje, kot je navedeno v točki 5, se vsebina po potrebi homogenizira in iz vsake enote se odvzame določena količina.

Posamični vzorci se lahko odvzamejo, ko se enota izprazni.

9.2.4 Tekoča ali poltekoča krma, ki ni primerna za homogeniziranje

Po izbiri zahtevanega števila enot za jemanje vzorcev, kot je navedeno v točki 5, se vzorci odvzamejo z različnih ravni.

Vzorci se lahko odvzamejo tudi, ko se enota prazni, vendar se prvi deli zavržejo.

Vsa odvzeta količina v nobenem primeru ne sme biti manjša od 10 litrov.

9.2.5 Krmni bloki in mineralni lizalni kamni

Po izbiri zahtevanega števila blokov ali lizalnih kamnov za vzorčenje, kot je navedeno v točki 5, se odvzame del vsakega bloka ali lizalnega kamna. Če obstaja sum, da je blok ali lizalni kamen nehomogeniziran, se lahko kot vzorec vzame cel blok ali lizalni kamen.

Pri blokih ali lizalnih kamnih, ki posamično ne tehtajo več kot 1 kg, je vsebina posamičnega vzorca en blok ali en kamen.

9.3 Priprava zbirnih vzorcev

Posamični vzorci se zmešajo, da sestavljajo zbirni vzorec.

9.4 Priprava končnih vzorcev

Material v zbirnem vzorcu se previdno zmeša ⁽²⁾.

⁽²⁾ Morebitne grude se razbijejo (po potrebi z ločevanjem in vrnitvijo v vzorec).

Vsak vzorec se shrani v ustrezen zabojnik/zbiralno posodo. Sprejeti je treba vse potrebne previdnostne ukrepe, da se med prevozom ali skladiščenjem prepreči kakršna koli sprememba sestave vzorca, onesnaženje ali mešanje.

9.4.1 Enakomerno porazdeljene snovi

Pri nadzoru sestavin ali snovi, ki so enakomerno porazdeljene po krmi, se lahko zbirni vzorec reprezentativno zmanjša na vsaj 2,0 kg ali 2,0 l (zmanjšani vzorec)⁽³⁾, po možnosti z uporabo mehanskega ali avtomatskega razdelilnika. Za nadzor nad vsebnostjo ostankov pesticidov v stročnicah, žitnih zrnih in lupinarjih je najmanjša velikost zmanjšane vzorca 3 kg. Če zaradi vrste krme ni mogoče uporabiti razdelilnika ali če ta ni na voljo, se lahko vzorec zmanjša z metodo četrtinjenja.

Iz zbirnih vzorcev ali zmanjšanih vzorcev se nato odvzamejo končni vzorci (za uradni nadzor, dopolnilno izvedensko mnenje in morebitne referenčne namene) približno enake količine, ki izpolnjujejo količinske zahteve iz točke 7.

9.4.2 Neenakomerno porazdeljene snovi

Pri nadzoru sestavin, vključno z gensko spremenjenimi snovmi, ali snovi, za katere obstaja verjetnost, da so neenakomerno porazdeljene po krmi, se zbirni vzorec:

- (i) popolnoma homogenizira. Nato se iz homogeniziranega zbirnega vzorca odvzamejo končni vzorci (za uradni nadzor, dopolnilno izvedensko mnenje in morebitne referenčne namene) približno enake količine, ki izpolnjujejo količinske zahteve iz točke 7, ali
- (ii) zmanjša na najmanj 2 kg ali 2 l⁽⁴⁾ z uporabo mehanskega ali avtomatskega razdelilnika. Samo v primeru, ko zaradi vrste krme ni mogoče uporabiti razdelilnika, se vzorec po potrebi lahko zmanjša z metodo četrtinjenja. Pri nadzoru glede prisotnosti gensko spremenjenih snovi v okviru Uredbe (EU) št. 619/2011 mora zmanjšani vzorec vsebovati najmanj 35 000 semen/zrn, da se lahko pridobijo končni vzorci za uradni nadzor, dopolnilno izvedensko mnenje in morebitne referenčne namene, ki vsebujejo najmanj 10 000 semen/zrn (glej opombo (**)) v točki 6 in opombo (*) v točki 7).

Iz zmanjšane vzorca se nato odvzamejo končni vzorci približno enake količine, ki izpolnjujejo količinske zahteve iz točke 7.

9.5 Pakiranje vzorcev

Zabojniki ali pakiranja se zapečatijo in označijo z etiketami tako, da jih ni mogoče odpreti, ne da bi se pri tem poškodoval pečat. Celotna etiketa mora biti vključena v pečat. Lahko pa se vzorec položi tudi v sprejemno posodo, ki se lahko zapre tako, da je ni mogoče odpreti, ne da bi se pri tem nepopravljivo poškodovala zbiralna posoda ali zabojnik, s čimer se prepreči ponovna uporaba zbiralne posode ali zabojnika.

9.6 Pošiljanje vzorcev v laboratorij

Vzorec se brez nepotrebnega odlašanja pošlje v pooblaščen analizni laboratorij skupaj z vsemi informacijami, ki jih potrebuje oseba, ki izvaja analizo.

10. ZAPISNIK O VZORČENJU

Ob odvzemu vzorca se napiše zapisnik o vzorčenju, ki omogoča nedvoumno prepoznavanje vsakega vzorčenega deleža in njegove velikosti.

V zapisniku je treba navesti tudi kakršno koli odstopanje od postopka vzorčenja, določenega v tej uredbi.

Izvod zapisnika prejme laboratorij za uradni nadzor ter nosilec dejavnosti poslovanja s krmo in/ali laboratorij, ki ga določi nosilec dejavnosti poslovanja s krmo.

⁽³⁾ Razen v primeru voluminozne krme/sveže krme z majhno specifično gostoto.

⁽⁴⁾ Razen v primeru voluminozne krme/sveže krme z majhno specifično gostoto.

11. VZOREC PRI PRODAJI NA DALJAVO

- Od nosilca dejavnosti poslovanja s krmo se prek sredstev za komuniciranje na daljavo zaprosi krma za vzorce pri prodaji na daljavo. V tem primeru se pristojnemu organu, ko zahteva krmo, nosilcu dejavnosti poslovanja s krmo ni treba identificirati z uradno identiteto in lahko uporabi tudi skrivno identiteto.
- Zbirni vzorec in končni vzorci iz vzorca pri prodaji na daljavo morajo biti odvzeti takoj, ko osebe, ki so pooblaščenke za ta namen, prejmejo pošiljko. Za pripravo zbirnega vzorca je treba naključno in enakomerno porazdeljeno iz skupne dobljene in previdno zmešane/homogenizirane količine odvzeti ustrezno število posamičnih vzorcev v skladu, kolikor je to mogoče, z načeli iz točke 5 ter točk 9.2 in 9.3. Če je krma pakirana v posamičnih enotah je treba pridobiti vsaj 4 enote, iz katerih je treba odvzeti vsaj en posamični vzorec. Če se izkaže za vsak primer posebej, da pridobljene enote izhajajo iz različnih lotov, se mora število enot, ki jih je treba vzorčiti, zmanjšati in omejiti na tiste enote, ki izvirajo iz istega lota. V primeru analize vzorca pri prodaji na daljavo za sestavine ali snovi, ki niso enakomerno porazdeljene po krmi, mora biti število posamičnih vzorcev vsaj 2,5-krat večje kot za vzorce, ki se analizirajo za snovi, enakomerno porazdeljene po celotni krmi.

Iz zbirnega vzorca se nato odvzamejo ustrezni končni vzorci (za uradni nadzor, dopolnilno izvedensko mnenje in morebitne referenčne namene) v skladu, kolikor je to izvedljivo, z načeli iz točke 9.4, v zapisniku o vzorčenju pa je navedeno, da gre pri vzorcu za vzorec pri prodaji na daljavo. Pristojni organ nato nosilca dejavnosti poslovanja s krmo nemudoma obvesti o vzorčenju. Nosilca dejavnosti poslovanja s krmo se obvesti tudi, da pristojni organ, kadar je mogoče, obdrži en vzorec (za dopolnilno izvedensko mnenje), ki jim je na voljo, in sicer na opredeljeni lokaciji za dopolnilno izvedensko mnenje, ali da se pošlje nosilcu dejavnosti poslovanja s krmo ali da se pošlje laboratoriju, ki ga določi nosilec dejavnosti poslovanja s krmo v skladu z veljavnimi nacionalnimi pravili.

Če se vzorec pošlje neposredno uradnemu laboratoriju, morajo končni vzorec v laboratoriju pripraviti in zapečatiti osebe, ki so pooblaščenke za ta namen, ali v prisotnosti oseb, ki so pooblaščenke za ta namen. Zapisnik o vzorčenju vzorca pri prodaji na daljavo je treba takoj po oblikovanju končnih vzorcev poslati pristojnemu organu, ki nosilca dejavnosti poslovanja s krmo obvesti o vzorčenju.

Šteje se, da količina, ki jo nosilec dejavnosti poslovanja s krmo pošlje pristojnemu organu, predstavlja del lota krme iz iste kategorije ali z istim opisom. V skladu s členom 15 Uredbe (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in Sveta ^(*), če se za navedeni lot ugotovi, da ne izpolnjuje zahtev EU, se domneva, tudi v primeru vzorca pri prodaji na daljavo, da je enako neustrezna vsa krma v zadevnem lotu, razen če po podrobni oceni (kadar je ustrezno, z inšpekcijo na kraju samem) ni nobenega dokaza, da preostanek lota ne izpolnjuje zahtev EU.“.

(*) Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane (UL L 31, 1.2.2002, str. 1).

PRILOGA II

„PRILOGA II

SPLOŠNE DOLOČBE O ANALIZNIH METODAH ZA KRMO

A. PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO

1. **Namen**

Postopki, opisani v tej prilogi, zadevajo pripravo vzorcev za analizo, ki se pošljejo kontrolnim laboratorijem po vzorčenju v skladu z določbami iz Priloge I.

Laboratorijski vzorci se morajo pripraviti tako, da so natehtane količine, določene za analizne metode, homogene in reprezentativne za končne vzorce.

Poleg postopkov, opisanih v tej prilogi, se upoštevajo tudi smernice za pripravo vzorca, kot so določene v standardu EN ISO 6498.

2. **Previdnostni ukrepi**

Postopek za pripravo vzorca je odvisen od uporabljene analizne metode in od sestavin ali snovi, ki se nadzirajo. Zato je zelo pomembno, da je postopek za pripravo vzorca primeren za uporabljeno analizno metodo in sestavine ali snovi, ki se nadzirajo.

Vse potrebne operacije se morajo izvesti tako, da se čim bolj preprečita onesnaženje vzorca in sprememba njegove sestave.

Mletje, mešanje in presejanje se izvedejo brez odlašanja, tako da je vzorec čim manj izpostavljen zraku in svetlobi. Uporaba mlinov in drobilcev, pri katerih se vzorec močno segreje, ni dovoljena.

Krmo, ki je posebej občutljiva na toploto, je priporočljivo drobiti ročno. Pri delu z napravo se zagotovi, da ta ni vir onesnaženja.

Izkazalo se je, da homogenizacija vzorca s pripravo suspenzije z visokostrižnim mešalnikom z vodo v nekaterih primerih zagotavlja bolj homogene podvzorce kot suha homogenizacija/mletje, zlasti v primeru heterogeno porazdeljenih kemijskih snovi. Vendar tudi homogenizacija z zadostno suhim mletjem lahko zagotovi homogene podvzorce.

V nekaterih primerih, na primer za določanje rženih rožičkov, škodljivih botaničnih nečistoč itd., homogenizacija vzorca ni mogoča z mletjem, temveč z zadostnim mešanjem vzorca.

Če pri pripravi ni mogoče preprečiti bistvene spremembe vsebnosti vlage v vzorcu, je treba v skladu z metodo iz dela A Priloge III določiti vsebnost vlage pred pripravo in po njej.

3. **Postopek**3.1 *Splošni postopek*

Iz končnega homogeniziranega vzorca se odvzame testni alikvot. Stožčasta delitev vzorca ali delitev vzorca v četrtine nista priporočljivi, ker se lahko pojavijo hude napake v delitvi testnih alikvotov.

3.1.1 Krma, ki jo je mogoče mleti kot tako

— Končni vzorec se premeša in zbere v primerno čisto in suho posodo z neprepustnim zamaškom. Tik preden se natehta količina za analizo (testni alikvot), se vzorec še enkrat premeša, da se zagotovi popolna homogenizacija.

3.1.2 Krma, ki jo je mogoče mleti po sušenju

— Če v analizni metodi ni navedeno drugače, se končni vzorec v skladu s postopkom za predhodno sušenje iz točke 4.3 metode za določanje vsebnosti vlage iz dela A Priloge III suši toliko časa, da se vsebnost vlage zniža na 8–12 %. Nato se nadaljuje, kakor je navedeno v točki 3.1.1.

3.1.3 Tekoča ali poltekoča krma

- Končni vzorec se zbere v primerno čisto in suho posodo z neprepustnim zamaškom. Tik preden se natehta količina za analizo (testni alikvot), se vzorec še enkrat dobro premeša, da se zagotovi popolna homogenizacija.

3.1.4 Druga krma

- Končni vzorci, ki se ne morejo pripraviti v skladu z enim izmed zgoraj navedenih postopkov, se obdelajo po katerem koli drugem postopku, ki zagotavlja, da bo količina vzorca, natehtana za analizo (testni alikvot), homogena in reprezentativna za končne vzorce.

3.2 Poseben postopek v primeru vizualnega pregleda ali mikroskopije ali kadar je homogeniziran celoten zbirni vzorec

- V primeru vizualnega pregleda (brez uporabe mikroskopa) se za pregled uporabi celoten zbirni ali končni vzorec.
- V primeru mikroskopskega pregleda lahko laboratorij zmanjša zbirni vzorec ali dodatno zmanjša zmanjšani vzorec. Končni vzorci za dopolnilno izvedensko mnenje in morebitne referenčne namene se odvzamejo v skladu s postopkom, ki je enakovreden postopku za jemanje končnega vzorca za uradni nadzor.
- Če je celoten zbirni vzorec homogeniziran, se končni vzorci odvzamejo iz homogeniziranega zbirnega vzorca.
- Za določitev rženega rožička in škodljivih botaničnih nečistoč se mora končni vzorec razdeliti na 2 podvzorca z enako maso po približno 500 gramov. Pregleda se en podvzorec. Če je rezultat podvzorcev enak ali manjši od 50 % (analizni prag) mejne vrednosti, je vzorec skladen z mejno vrednostjo. Če je rezultat nad 50 % mejne vrednosti, je treba pregledati še en podvzorec in za preverjanje skladnosti z mejno vrednostjo uporabiti povprečje rezultatov dveh podvzorcev.

4. Shranjevanje vzorcev

Vzorci se morajo hraniti pri temperaturi, ki ne bo spremenila njihove sestave. Vzorci, namenjeni za analizo vitaminov ali snovi, ki so posebno občutljive na svetlobo, se hranijo pod pogoji, ki preprečujejo škodljiv učinek svetlobe na vzorec.

B. DOLOČBE O REAGENTIH IN NAPRAVI, KI SE UPORABLJAJO PRI ANALIZNIH METODAH

1. Če v analiznih metodah ni posebej določeno, morajo biti vsi reagenti za analizo analizno čisti (a.č.). Pri analiziranju sledov se mora čistost reagentov preveriti s slepim preskusom. Glede na dobljene rezultate je morda potrebno dodatno čiščenje reagentov.
2. Pri vseh postopkih analiznih metod, ki vključujejo pripravo raztopin, razredčevanje, spiranje ali izpiranje in pri katerih vrsta uporabljenega topila ali razredčila ni navedena, se mora uporabiti voda. Praviloma je voda demineralizirana ali destilirana. V posameznih primerih, ki so posebej navedeni v analiznih metodah, jo je treba prečistiti s posebnimi postopki.
3. V zvezi z opremo, ki je običajno v kontrolnih laboratorijih, so pri analiznih metodah navedeni le posebni instrumenti in naprave ali tisti, ki zahtevajo posebno uporabo. Biti morajo čisti, zlasti pri določanju zelo majhnih količin snovi.

C. UPORABA ANALIZNIH METOD IN PRIKAZ REZULTATOV

1. Postopek ekstrakcije

Pri številnih metodah je določen poseben postopek ekstrakcije. Praviloma se lahko uporabijo postopki ekstrakcije, ki se razlikujejo od postopka iz metode, če je za uporabljeni postopek učinkovitost ekstrakcije za analiziran matriks dokazano enakovredna postopku iz metode.

2. Postopek čiščenja

Pri številnih metodah je določen poseben postopek čiščenja. Praviloma se lahko uporabijo drugi postopki čiščenja, ki se razlikujejo od postopka iz metode, če je za uporabljeni postopek analizna učinkovitost čiščenja za analiziran matriks dokazano enakovredna postopku iz metode.

3. Število določanj

Če je pri analizi nezaželenih snovi rezultat prvega določanja bistveno (> 50 %) nižji od specifikacije, ki se nadzira, dodatna določanja niso potrebna, če so bili uporabljeni ustrezni postopki kakovosti. V drugih primerih je potrebna dvakratna analiza (drugo določanje), da se izključi možnost internega navzkrižnega onesnaženja ali naključne zamenjave vzorcev. Za nadaljnjo oceno se uporabi povprečje dveh določanj.

Če so pri nadzoru minimalnih ali maksimalnih ravni krmnih dodatkov rezultati prvega določanja nad minimalno ravno ali pod maksimalno ravno, dodatna določanja niso potrebna, če so bili uporabljeni ustrezni postopki kakovosti. V drugih primerih je potrebna dvakratna analiza (drugo določanje), da se izključi možnost internega navzkrižnega onesnaženja ali naključne zamenjave vzorcev. Za nadaljnjo oceno se uporabi povprečje dveh določanj.

Pri nadzoru navedene vsebnosti snovi ali sestavine, če rezultat prvega določanja potrdi navedeno vsebnost, tj. rezultat analize je znotraj sprejemljivih meja odstopanja navedene vsebnosti, dodatna določanja niso potrebna, če so bili uporabljeni ustrezni postopki kakovosti. V drugih primerih je potrebna dvakratna analiza (drugo določanje), da se izključi možnost internega navzkrižnega onesnaženja ali naključne zamenjave vzorcev. Za nadaljnjo oceno se uporabi povprečje dveh določanj (povprečni rezultat analize je znotraj sprejemljivih meja odstopanja navedene vsebnosti ali ne).

V nekaterih primerih so te sprejemljive meje odstopanja opredeljene v zakonodaji, ko sta Uredba (ES) št. 767/2009 in Uredba (EU) 2019/4 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾.

4. Poročanje o uporabljeni analizni metodi

V poročilu o analizi se navede uporabljena analizna metoda.

5. Poročanje o rezultatih analize

Rezultat analize se prikaže tako, kakor je navedeno v analizni metodi, na primerno število decimalnih mest, in se po potrebi popravi glede na vsebnost vlage v končnem vzorcu pred pripravo.

Večina regulativnih ravni (npr. maksimalna raven, minimalna raven) v zakonodaji EU o krmi je določena glede na krmo z vsebnostjo vlage 12 %. Zato je treba v teh primerih za ocenitev rezultata analize, izmerjen na vzorcu glede na regulativno raven, rezultat analize najprej deliti z vsebnostjo suhe snovi v vzorcu (v %), pomnoženo z 88, kot je navedeno v naslednji formuli:

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

pri čemer je:

- Mc: vsebnost vlage v vzorcu (v %). 100 – Mc tako predstavlja vsebnost suhe snovi v vzorcu (v %).
- R_{ana} : rezultat analize, izmerjen na vzorcu.
- $R_{12\%}$: rezultat za krmo z vsebnostjo vlage 12 %; oceni se glede na regulativno raven.

⁽¹⁾ Uredba (EU) 2019/4 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 11. decembra 2018 o proizvodnji, dajanju v promet, uporabi medicirane krme, spremembi Uredbe (ES) št. 183/2005 Evropskega parlamenta in Sveta ter razveljavitvi Direktive Sveta 90/167/EGS (UL L 4, 7.1.2019, str. 1).

Poleg tega, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

- rezultat analize je bistveno ($> 50\%$) nižji ali višji od označenih informacij/specifikacije, ki se nadzira(-jo) (odvisno od tega, ali je na označenih informacijah/v specifikaciji navedena maksimalna ali minimalna raven),
- vsebnost vlage v vzorčeni krmi je znana in lahko se določi, da popravek za vsebnost vlage ne bo spremenil ocene;

potem se pod pogojem, da se uporabijo ustrezni postopki kakovosti in analiza služi samo preverjanju skladnosti s pravnimi določbami, popravek za vsebnost vlage lahko izpusti (npr. v primerih, kadar ni specifikacije ali regulativne ravni), razen če se zahteva za interpretacijo.

Če se rezultat analize popravi za vsebnost vlage, se mora v istem postopku popraviti tudi ustrezna merilna negotovost.

V primeru določanja rženega rožička ali škodljivih botaničnih nečistoč z vizualnim/mikroskopskim pregledom popravek za vsebnost vlage ni potreben.

6. Analizna merilna negotovost in stopnja izkoristka pri analizi nezaželenih snovi

V zvezi z nezaželenimi snovmi po Direktivi 2002/32/ES se proizvod, namenjen za krmo, šteje za neskladnega z določeno najvišjo vsebnostjo, če rezultat analize kot povprečje dveh neodvisnih določanj za krmo z vsebnostjo vlage 12% presega najvišjo vsebnost ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti z uporabo faktorja zajetja 2, ki pomeni stopnjo zaupanja približno 95% , in popravka za izkoristek. To pomeni, da se za oceno skladnosti uporabi analizirana koncentracija, popravljena za izkoristek, od katere se odšteje razširjena analizna merilna negotovost. Ta postopek se uporablja samo v primerih, kadar analizna metoda omogoča oceno razširjene analizne merilne negotovosti in popravka za izkoristek (npr. se ne zahteva v primeru vizualnega/mikroskopskega pregleda).

Če rezultat analize vzorca, odvzetega za dopolnilno izvedensko mnenje, presega najvišjo vsebnost (brez upoštevanja razširjene analizne merilne negotovosti), to potrjuje neskladnost, ugotovljeno s kontrolnim vzorcem, če ne obstajajo specifična nacionalna pravila v zvezi s tem.

O rezultatu analize se poroča (če uporabljena analizna metoda omogoča oceno razširjene analizne merilne negotovosti) na naslednji način:

- (a) kadar je to primerno in ustrezno, se mora navesti popravek za izkoristek in kdaj je bil ta popravek opravljen. Stopnjo izkoristka je treba navesti, razen če je dejanski popravek zaradi odstopanja del postopka, pri čemer je odstopanje razlika med izmerjeno vrednostjo in referenčno koncentracijo. Popravek za izkoristek ni potreben, če je stopnja izkoristka med $90\text{--}110\%$;
- (b) kot $x \pm U$, pri čemer je x rezultat analize in U razširjena analizna merilna negotovost, ob uporabi faktorja za zajetje 2 ⁽²⁾, zaradi katerega je stopnja zaupanja približno 95-odstotna .

Vendar če je rezultat analize bistveno ($> 50\%$) nižji od specifikacije, ki se nadzira, in je bil uporabljen ustrezni postopek kakovosti ter je namen analize le preverjanje skladnosti z zakonodajnimi določbami, se lahko poročanje o stopnji izkoristka in razširjeni analizni merilni negotovosti izpusti (npr. v primerih, kadar ni specifikacije ali regulativne ravni), razen če je merilna negotovost potrebna za interpretacijo.

7. Analizna merilna negotovost in stopnja izkoristka pri analizi vsebnosti krmnih dodatkov

Za preverjanje skladnosti z odobreno najnižjo in najvišjo vsebnostjo krmnih dodatkov se prisotnost krmnega dodatka šteje za neskladno z določeno najnižjo in najvišjo vsebnostjo, če se za rezultat analize kot povprečje dveh neodvisnih določanj glede na krmo z vsebnostjo vlage 12% šteje:

⁽²⁾ 95-odstotni interval zaupanja se lahko doseže z uporabo drugega faktorja, kot je t-faktor.

- da presega najvišjo vsebnost, ob upoštevanju razširjene analizne merilne negotovosti in popravka za izkoristek. To pomeni, da se za oceno skladnosti uporabi analizirana koncentracija (tj. povprečje dveh določanj), popravljena za izkoristek, od katere se odšteje razširjena analizna merilna negotovost,
- da je nižji od najnižje vsebnosti, ob upoštevanju razširjene analizne merilne negotovosti in popravka za izkoristek. To pomeni, da se za oceno skladnosti uporabi analizirana koncentracija (tj. povprečje dveh določanj), popravljena za izkoristek, ki se ji prišteje razširjena analizna merilna negotovost.

Če rezultat analize vzorca, odvzetega za dopolnilno izvedensko mnenje, presega najvišjo vsebnost (brez upoštevanja razširjene analizne merilne negotovosti), to potrjuje neskladnost, ugotovljeno s kontrolnim vzorcem, če ne obstajajo specifična nacionalna pravila v zvezi s tem.

O rezultatu analize se poroča (če uporabljena analizna metoda omogoča oceno razširjene analizne merilne negotovosti) na naslednji način:

- (a) kadar je to primerno in ustrezno, se mora navesti popravek za izkoristek in kdaj je bil ta popravek opravljen. Stopnjo izkoristka je treba navesti, razen če je dejanski popravek zaradi odstopanja del postopka, pri čemer je odstopanje razlika med izmerjeno vrednostjo in referenčno koncentracijo. Popravek za izkoristek ni potreben, če je stopnja izkoristka med 90–110 %;
- (b) kot „ $x \pm U$ “, pri čemer je x rezultat analize (povprečje dveh določanj) in U razširjena analizna merilna negotovost, ob uporabi faktorja za zajetje 2 ⁽³⁾, zaradi katerega je stopnja zaupanja približno 95-odstotna.“.

—

⁽³⁾ 95-odstotni interval zaupanja se lahko doseže z uporabo drugega faktorja, kot je t-faktor.

PRILOGA III

„PRILOGA III

ANALIZNE METODE ZA NADZOR SESTAVE POSAMIČNIH KRMIL IN KRMNIH MEŠANIC

A. DOLOČANJE VLAGE

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje vsebnosti vlage v krmi. Kadar krma vsebuje hlapne snovi, kot so organske kisline, je treba upoštevati, da se pri določanju vsebnosti vlage zajame tudi bistveno število hlapnih snovi.

Ta metoda ne zajema analizo mlečnih proizvodov kot posamičnih krmil in krmnih mešanic, sestavljenih predvsem iz mlečnih proizvodov, analizo živalskih in rastlinskih maščob in olj ali analizo oljnih semen in oljnatega sadja.

Vsebnost vlage v oljnicah se določi z metodo, kot je opredeljena v standardu EN ISO 665 Določevanje vlage in hlapnih snovi, ob upoštevanju, da je sojina zrna treba zmleti pred določevanjem vsebnosti vlage.

2. Načelo

Vzorec se osuši pri določenih pogojih, ki se spreminjajo glede na vrsto krme. Izguba mase se določi s tehtanjem. Pri trdni krmi z visoko vsebnostjo vlage je treba izvesti predhodno sušenje.

3. Naprava

3.1 Drobilec iz materiala, ki ne absorbira vlage, in se lahko enostavno čisti, omogoča hitro in enakomerno drobljenje brez pregretja, v največji možni meri preprečuje stik z zunanjim zrakom ter ustreza zahtevam iz točk 4.1.1 in 4.1.2 (npr. udarni ali vodno hlajeni mikrodrobilci, konusni mlini, počasni drobilniki ali drobilniki na zobata kolesa).

3.2 Analizna tehtnica, natančna na 1 mg.

3.3 Suhe posode iz nerjaveče kovine ali stekla s pokrovi, ki omogočajo zapiranje, neprepustno za zrak; delovna površina, ki omogoča razprostrtje preskusnega vzorca na približno 0,3 g/cm².

3.4 Električno ogrevan izotermični sušilnik (± 2 °C) s primerno ventilacijo in ki zagotavlja hitro uravnavanje temperature ⁽¹⁾.

3.5 Nastavljiv električni vakuumski sušilnik, opremljen z oljno črpalko in mehanizmom za dovajanje suhega vročega zraka ali s sušilnim sredstvom (npr. kalcijevim oksidom).

3.6 Eksikator z debelo kovinsko ali porcelansko perforirano ploščo, ki vsebuje učinkovito sušilno sredstvo.

4. Postopek

Opomba: Postopki, opisani v tem oddelku, se morajo izvajati takoj po odprtju pakiranj z vzorci. Analiza se mora izvesti vsaj dvakrat.

⁽¹⁾ Za sušenje žita, moke, drobljencev in zdroba mora imeti sušilnik takšno toplotno kapaciteto, da se bo, ko je predhodno nastavljen na 131 °C, vrnil na to temperaturo v manj kot 45 minutah, potem ko je bilo vanj za sušenje hkrati postavljeno največje možno število preskusnih vzorcev. Ventilacija mora biti takšna, da se, ko se v sušilniku dve uri suši največje možno število vzorcev pšenice, rezultati razlikujejo za manj kot 0,15 % od tistih, ki so bili sušeni štiri ure.

4.1 *Priprava*

4.1.1 Krma, razen tiste iz točk 4.1.2 in 4.1.3

Vzame se vsaj 50 g vzorca. Po potrebi se zdrobi ali razdeli tako, da se prepreči vsakršna sprememba vsebnosti vlage (glej točko 6).

4.1.2 Žita in drobljenci

Vzame se vsaj 50 g vzorca. Zdrobi se tako, da najmanj 50 % delcev preide skozi sito z odprtinami velikosti 0,5 mm in jih na situ z okroglimi odprtinami velikosti 1 mm ostane največ 10 %.

4.1.3 Tekoča ali kašasta krma in krma, sestavljena predvsem iz olj in maščob

Približno 25 g vzorca se natehta na 10 mg natančno, doda se primerna količina brezvodnega peska, stehtanega na 10 mg natančno, in se meša do nastanka homogene mase.

4.2 *Sušenje*

Posoda (točka 3.3) s pokrovom se 30 min +/- 1 min suši v sušilniku, nastavljenem na 103 °C. Odstrani se iz sušilnika in ohladi na sobno temperaturo v eksikatorju (točka 3.6).

4.2.1 Krma, razen tiste iz točk 4.2.2 in 4.2.3

Posoda s pokrovom se stehta na 1 mg natančno. V stehtano posodo se natehta približno 5 g vzorca na 1 mg natančno, ki se enakomerno porazdeli. Posoda brez pokrova se postavi v sušilnik, segret na 103 °C. Posoda se postavi v sušilnik v najkrajšem možnem času, da se prepreči prevelik padec temperature. Sušenje traja štiri ure od trenutka, ko je temperatura v sušilniku ponovno 103 °C. Sušilnik se odpre, posoda se takoj pokrije s pokrovom in vzame iz peči, pusti se 30 do 45 minut v eksikatorju (točka 3.6), da se ohladi, in stehta na 1 mg natančno.

Krma, sestavljena predvsem (> 50 %) iz olj in maščob živalskega in rastlinskega izvora, se suši v sušilniku nadaljnjih 30 minut pri 103 °C. Razlika med obema tehtanjema ne sme presegati 0,1 % vlage.

4.2.2 Žita, moka, drobljenci in zdrob

Posoda s pokrovom se stehta na 0,5 mg natančno. V stehtano posodo se natehta približno 5 g zdrobljenega vzorca na 1 mg natančno, ki se enakomerno porazdeli. Posoda brez pokrova se postavi v sušilnik, segret na 130 °C. Posoda se postavi v sušilnik v najkrajšem možnem času, da se prepreči prevelik padec temperature. Sušenje traja dve uri od trenutka, ko je temperatura v sušilniku ponovno 130 °C. Sušilnik se odpre, posoda se takoj pokrije s pokrovom in vzame iz peči, pusti se 30 do 45 minut v eksikatorju (točka 3.6), da se ohladi, in stehta na 1 mg natančno.

4.2.3 Krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 4 % saharoze ali laktoze: posamična krmila, kot so rožiči, hidrolizirani žitni proizvodi, fermentirana semena, posušena mleta pesa, ribe in raztopine sladkorja.

Posoda s pokrovom se stehta na 0,5 mg natančno. V stehtano posodo se natehta približno 5 g vzorca na 1 mg natančno, ki se enakomerno porazdeli. Posoda brez pokrova se postavi v vakuumski sušilnik (točka 3.5), segret na 80 °C–85 °C. Posoda se postavi v sušilnik v najkrajšem možnem času, da se prepreči prevelik padec temperature.

Počaka se, da tlak naraste do 100 torov in pri tem tlaku sušenje traja štiri ure na vročem suhem zraku ali s sušilnim sredstvom (približno 300 g za 20 vzorcev). V zadnjem primeru se vakuumaska črpalka izklopi, ko je želeni tlak dosežen. Čas sušenja se računa od trenutka, ko je temperatura v sušilniku ponovno 80 °C–85 °C. Tlak v sušilniku se previdno izenači z atmosferskim. Sušilnik se odpre, posoda se takoj pokrije s pokrovom in vzame iz peči, pusti se 30 do 45 minut v eksikatorju (točka 3.6), da se ohladi, in stehta na 1 mg natančno. Suši se nadaljnjih 30 minut v vakuumskem sušilniku pri 80 °C–85 °C in ponovno stehta. Razlika med obema tehtanjenjema ne sme presegati 0,1 % vlage.

4.3 Predhodno (delno) sušenje

„Mokro“ krmo z masnim deležem manj kot 85 % suhe snovi (npr. sveža krma, skupni mešani obroki, netekoča hrana) je treba pred finim mletjem delno posušiti, da se analizirajo njene stabilne snovi; za nestabilne snovi delno sušenje ni mogoče.

Delno sušenje se lahko izvede v sušilniku s prisilnim zračnim tokom ali mikrovalovni pečici ali s sušenjem z zamrzovanjem. Razen pri delnem sušenju z zamrzovanjem je namen tega sušiti krmo ter hkrati ohraniti temperaturo vzorca pod 60 °C, tako da to le minimalno učinkuje na kemijsko sestavo. Sušenje pri temperaturah, višjih od 60 °C, povzroča kemijske spremembe v krmi (npr. razgradnja beljakovin). Posušena krma se uravnoteži na sobni temperaturi za približno 15 minut, preden se izmeri delna suha snov, tako da se čim bolj zmanjša morebitna sprememba vlage, do katere lahko pride med mletjem in shranjevanjem. S sušenjem pri temperaturah, nižjih od 60 °C, se ne odstrani vsa voda iz krme, zato (začetno) delno sušenje ne omogoča določanja skupne suhe snovi v krmi. Po sušenju se podvzorec zmleje in analizira za (končno) suho snov delno suhega vzorca (preostala vsebnost vlage 3 %–15 %), ko se določi druge kemijske sestavine.

Zato se priporoča dvostopenjski postopek za določanje suhe snovi. Najprej se določi delna vsebnost suhe snovi (če je manj kot 85 % suhe snovi), nato se določi preostala vsebnost suhe snovi na zmletem preskusnem vzorcu ter pomnoži delna suha snov s preostalo suho snovjo, da se določi skupna vsebnost suhe snovi.

5. Izračun rezultatov

Vsebnost vlage (X), izražena kot masni delež vzorca, se izračuna po naslednji formuli:

5.1 Sušenje brez predhodnega sušenja

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

pri čemer je:

m = začetna masa preskusnega vzorca v gramih;

m₀ = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

5.2 Sušenje s predhodnim sušenjem ⁽²⁾

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

pri čemer je:

m = začetna masa preskusnega vzorca v gramih;

m₁ = masa preskusnega vzorca po predhodnem sušenju v gramih;

m₂ = masa preskusnega vzorca po drobljenju ali mletju v gramih;

m₀ = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

⁽²⁾ Za več podrobnosti o izračunu je naveden sklic na EN ISO 6498 – Krma – Smernice za pripravo vzorca.

5.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne presega 0,2 % absolutne vrednosti vlage, razen za mokro hrano za hišne živali in pasje žvečilke, pri katerih razlika ne presega 0,5 % absolutne vrednosti vlage.

6. Opomba

Če se izkaže, da je potrebno drobljenje, in če se izkaže, da se pri tem spremeni vsebnost vlage v proizvodu, se morajo rezultati analize sestavin krme popraviti za vsebnost vlage v vzorcu v prvotnem stanju.

B. DOLOČANJE VLAJE V MAŠČOBAH IN OLJIH ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje vsebnosti vode in hlapnih snovi v maščobah in oljih živalskega in rastlinskega izvora.

2. Načelo

Vzorec se posuši do konstantne mase (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ne sme presegati 1 mg) pri 103 °C. Izguba mase se določi s tehtanjem.

3. Naprava

3.1 Posoda z ravnim dnom iz nerjavečega materiala s premerom 8 cm do 9 cm in višino približno 3 cm.

3.2 Termometer z utrjeno bučko in podaljškom na zgornjem delu, s skalo od približno 80 °C do vsaj 110 °C in dolžino približno 10 cm.

3.3 Peščena kopel ali električna kuhalna plošča

3.4 Eksikator, ki vključuje učinkovito sušilno sredstvo.

3.5 Analizna tehtnica.

4. Postopek

Približno 20 g homogeniziranega vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v suho, stehtano posodo (točka 3.1), v kateri je termometer (točka 3.2). Ob nenehnem mešanju s termometrom se segreva na peščeni kopeli ali električni kuhalni plošči (točka 3.3) tako, da temperatura doseže 90 °C v približno 7 minutah.

Temperatura se zniža, pri čemer se opazuje pogostost dviganja mehurčkov z dna posode. Temperatura ne sme preseči 105 °C. Nadaljuje se z mešanjem in pri tem se drgne dno posode, dokler mehurčki ne prenehajo izhajati.

Da se zagotovi popolna odstranitev vlage, se večkrat segreje na 103 °C ± 2 °C ob ohlajevanju na 93 °C med zaporednimi segrevanji. Nato se pusti, da se vzorec v eksikatorju (točka 3.4) ohladi na sobno temperaturo, in se stehta. Postopek se ponavlja, dokler izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ni manjša od 2 mg.

Opomba Povečanje mase vzorca po ponovljenem segrevanju kaže na oksidacijo maščobe, v tem primeru je treba upoštevati rezultat tehtanja, izvedenega neposredno pred začetkom povečevanja mase.

5. Izračun rezultatov

Masni delež vlage (X) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa preskusnega vzorca v gramih;

m_1 = masa posode z vsebino pred segrevanjem v gramih;

m_2 = masa posode z vsebino po segrevanju v gramih.

Rezultati, nižji od 0,05 %, se navedejo kot „manj kot 0,05 %“.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,1 % v absolutni vrednosti.

C. DOLOČANJE VSEBNOSTI DUŠIKA IN IZRAČUN VSEBNOSTI SUROVIH BELJAKOVIN

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje vsebnosti surovih beljakovin v krmi na podlagi vsebnosti dušika, določenega po Kjeldahlovi metodi ⁽³⁾.

2. Načelo

Vzorec se razkroji z žveplovo kislino v prisotnosti katalizatorja. Raztopina natrijevega hidroksida se doda kisli raztopini, da postane bazična. Amonijak se destilira in zbere v odmerjeno količino žveplove kisline, katere presežek se titrira s standardno raztopino natrijevega hidroksida.

Sproščeni amonijak se lahko destilira v presežek raztopine borove kisline ter nato titrira z raztopino klorovodikove ali žveplove kisline.

3. Reagenti

3.1 Kalijev sulfat.

3.2 Katalizator: bakrov (II) oksid CuO ali bakrov (II) sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.3 Cink v zrnkih.

3.4 Žveplova kislina, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.

3.5 Žveplova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$

3.6 Žveplova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$

3.7 Žveplova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$

3.8 Indikator metil rdeče; 300 mg metil rdečega se raztopi v 100 ml etanola, $\sigma = 95 \text{ \%} - 96 \text{ \% (v/v)}$.

3.9 Raztopina natrijevega hidroksida (lahko se uporabi tehnična) $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$.

3.10 Žveplova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.11 Žveplova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

3.12 Zdrobljen plovec, opran v klorovodikovi kislini in prežaren.

3.13 Acetanilid (tališče = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, N-vsebnost = $10,36 \text{ \%}$).

3.14 Saharoza (brez dušika).

3.15 Borova kislina (H_3BO_3).

⁽³⁾ Vsebnost dušika se lahko določi v vsej krmi, toda faktor pretvorbe 6,25 za izračun vsebnosti surovih beljakovin se morda ne more uporabiti za posamična krmila z žuželkami (nižji faktor pretvorbe) ter nekatero hrano za hišne živali in krvne plazemske beljakovine (višji faktor pretvorbe).

- 3.16 Raztopina indikatorja metil rdeče: 100 mg metil rdečega se raztopi v 100 ml etanola ali metanola.
- 3.17 Raztopina bromokrezol zelenega: 100 mg bromokrezol zelenega se raztopi v 100 ml etanola ali metanola.
- 3.18 Raztopina borove kisline (10 g/l–40 g/l glede na uporabljeno napravo).

Pri določanju s kolorimetrično ekvivalentno točko se morata raztopinam borove kisline dodati indikatorja metil rdeče in bromokrezol. Pri pripravi 1 litra raztopine borove kisline se pred uravnavanjem volumna doda 7 ml raztopine indikatorja metil rdeče (točka 3.16) in 10 ml raztopine bromokrezol zelenega (točka 3.17).

Glede na uporabljeno vodo se lahko pH raztopine borove kisline med serijami razlikuje. Vrednost pH raztopine borove kisline mora biti med 4,3 in 4,7. Pogosto je za doseganje pozitivnega slepega vzorca treba dodati majhen volumen baze.

Opomba: 3 ml do 4 ml NaOH (točka 3.11) v 1 liter borove kisline v koncentraciji 10 g/l običajno zadošča. Raztopina se shrani pri sobni temperaturi ter zaščiti pred svetlobo in viri amonijevih hlapov.

- 3.19 Klorovodikova kislina, standardna volumetrična raztopina, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Opomba: Druge koncentracije volumetričnih raztopin (točke 3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 in 3.19) se lahko uporabljajo, če se upoštevajo v izračunih. Koncentracije se vedno izrazijo na štiri decimalke natančno.

4. **Naprava**

Naprava, primerna za izvajanje razklopa, destilacije in titracije po Kjeldahlovi metodi.

5. **Postopek**

5.1 **Razklop**

1 g vzorca se natehta na 0,001 g natančno in se prenese v bučko naprave za razklop. Doda se 15 g kalijevega sulfata (točka 3.1), ustrezna količina katalizatorja (točka 3.2) (0,3 g–0,4 g bakrovega (II) oksida ali 0,9 g–1,2 g bakrovega (II) sulfat pentahidrata), 25 ml žveplove (VI) kisline (točka 3.4) in po potrebi nekaj zrnc plovca (točka 3.12) ter vse skupaj premeša.

Bučka se najprej zmerno segreva in po potrebi občasno obrne, dokler masa ne zogljeni in pena ne izgine; nato se močneje segreva do enakomernega vretja tekočine. Segrevanje je ustrezno, če se vrela kislina kondenzira na stenah bučke. Paziti je treba, da se stene bučke ne pregrejejo in da se organski delci ne sprimejo nanje.

Ko se raztopina zbistri in obarva rahlo zeleno, se pusti vreti še dve uri, nato pa pusti, da se ohladi.

5.2 **Destilacija**

Previdno se doda toliko vode, da se sulfati povsem raztopijo. Pusti se, da se ohladi, nato pa se po potrebi doda nekaj zrnc cinka (točka 3.3). Nadaljuje se v skladu s točko 5.2.1 ali 5.2.2.

5.2.1 **Destilacija v žveplovo kislino**

V zbirno bučko naprave za destilacijo se doda natančno 25 ml žveplove kisline (točka 3.5) ali (točka 3.7) glede na pričakovano vsebnost dušika. Doda se nekaj kapljic indikatorja metil rdeče (točka 3.8).

Bučka za razklop se poveže s kondenzatorjem naprave za destilacijo in konica kondenzatorja se potopi v tekočino v zbirni bučki vsaj do globine 1 cm (glej točko 8.3). V bučko za razklop se počasi vlije 100 ml raztopine natrijevega hidroksida (točka 3.9) tako, da ne pride do izgube amonijaka (glej točko 8.1). Bučka se segreva do popolne destilacije amonijaka.

5.2.2 Destilacija v borovo kislino

Pri ročni titraciji amonijaka iz destilata se uporablja spodaj navedeni postopek. Kadar je destilacijska enota v celoti avtomatizirana in vključuje titracijo amonijaka iz destilata, se upoštevajo navodila proizvajalca za upravljanje z destilacijsko enoto.

Zbirna bučka s 25 ml–30 ml raztopine borove kisline (točka 3.18) se postavi pod izhodno odprtino kondenzatorja tako, da je dovodna cev pod površino presežka raztopine borove kisline. Destilacijska enota se nastavi tako, da se dovaja 50 ml raztopine natrijevega hidroksida (točka 3.9). Destilacijska enota se upravlja v skladu z navodili proizvajalca, sproščeni amonijak pa se destilira z raztopino natrijevega hidroksida. Destilat se zbere v raztopino borove kisline. Količina destilata (čas parne destilacije) je odvisna od količine dušika v vzorcu. Upoštevati je treba navodila proizvajalca.

Opomba: V polavtomatski destilacijski enoti sta dodajanje presežka natrijevega hidroksida in parna destilacija avtomatizirana postopka.

5.3 Titracija

Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.1 ali 5.3.2.

5.3.1 Žveplova kislina

Presežek žveplove kisline v zbirni bučki se titrira do ekvivalentne točke z raztopino natrijevega hidroksida (točka 3.10 ali 3.11) glede na koncentracijo uporabljene žveplove kisline.

5.3.2 Borova kislina

Vsebina zbirne bučke se titrira s standardno volumetrično raztopino klorovodikove kisline (točka 3.19) ali standardno volumetrično raztopino žveplove kisline (točka 3.6), pri čemer se uporabi bireta in odčita količina uporabljene titracijske snovi.

Pri določanju s kolorimetrično ekvivalentno točko je ekvivalentna točka dosežena pri prvem znaku rožnatega obarvanja vsebine. Volumen birete se odčita na 0,05 ml natančno. Magnetna mešalna plošča z osvetlitvijo ali fotometrični detektor lahko pripomoreta k določanju ekvivalentne točke.

Parni destilator z avtomatsko titracijo lahko to opravi avtomatsko.

Upoštevati je treba navodila proizvajalca za upravljanje specifičnega destilatorja ali destilatorja/titratorja.

Opomba: Pri avtomatskem sistemu titriranja se titracija začne takoj po začetku destilacije, uporabi pa se 1-odstotna raztopina borove kisline (točka 3.18).

Pri popolnoma avtomatizirani destilacijski enoti se lahko izvaja avtomatična titracija amonijaka, ekvivalentna točka pa se lahko določa s potenciometričnim pH sistemom.

V tem primeru se uporablja avtomatski titrator s pH metrom. Ta pH meter se ustrezno umeri med pH 4 in pH 7 z običajnimi laboratorijskimi postopki za umerjanje pH.

Ekvivalentna točka pH pri titraciji je dosežena pri pH 4,6, ko je naklon titracijske krivulje največji (točka pregiba).

5.4 Slepi preskus

Slepi preskus (razklop, destilacija in titracija), v katerem se namesto vzorca uporabi 1 g saharoze (točka 3.14), se izvede za potrditev, da reagenti ne vsebujejo dušika.

6. Izračun rezultatov

Izračuni se izvedejo v skladu s točko 6.1 ali 6.2.

6.1 Izračun za titracijo v skladu s točko 5.3.1

Vsebnost surovih beljakovin, izražena kot masni delež, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

V_0 = volumen (v ml) NaOH (točka 3.10 ali 3.11), uporabljen pri slepem preskusu;

V_1 = volumen (v ml) NaOH (točka 3.10 ali 3.11), uporabljen pri titraciji vzorca;

c = koncentracija (v mol/l) natrijevega hidroksida (točka 3.10 ali 3.11);

m = masa vzorca (v g).

6.2 Izračun za titracijo v skladu s točko 5.3.2

6.2.1 Titracija s klorovodikovo kislino

Vsebnost surovih beljakovin, izražena kot masni delež, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa preskusnega deleža (v g);

c = koncentracija (v mol/l) standardne volumetrične raztopine klorovodikove kisline (točka 3.19);

V_0 = volumen (v ml) klorovodikove kisline, uporabljen pri slepem preskusu;

V_1 = volumen (v ml) klorovodikove kisline, uporabljen v preskusnem deležu.

6.2.2 Titracija s žveplovo kislino

Vsebnost surovih beljakovin, izražena kot masni delež, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa preskusnega deleža (v g);

c = koncentracija (v mol/l) standardne volumetrične raztopine žveplove kisline (točka 3.6);

V_0 = volumen (v ml) žveplove kisline (točka 3.6), uporabljen v slepem preskusu;

V_1 = volumen (v ml) žveplove kisline (točka 3.6), uporabljen v preskusnem deležu.

7. Preverjanje metode

7.1 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

- 0,4 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin pod 20 %,
- 2,0 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti surovih beljakovin od 20 % do 40 %,
- 0,8 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin nad 40 %.

7.2 Obnovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, izvedena na istem vzorcu v različnih laboratorijih ne sme presegati:

- 1,8 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin pod 20 %,
- 9,0 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti surovih beljakovin od 20 % do 40 %,
- 3,6 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin nad 40 %.

7.3 Točnost

Za analizo (razklop, destilacija, titracija) se uporabi ustrezna količina acetanilida (točka 3.13) (npr. 0,2 g do 0,3 g) ob navzočnosti 1 g saharoze (točka 3.14); za 1 g acetanilida se porabi 14,80 ml žveplove kisline (točka 3.5). Izkoristek mora biti najmanj 99-odstoten.

8. Opombe

- 8.1 Naprava je lahko ročna, polavtomatska ali avtomatska. Če je pri napravi med razklopom in destilacijo potreben prenos, se ta prenos mora izvesti brez kakršne koli izgube. Če bučka naprave za destilacijo ni opremljena s kapalnim lijakom, se natrijev hidroksid doda tik pred povezavo bučke s kondenzatorjem, pri čemer se tekočina vlija počasi ob steni bučke.
- 8.2 Če se vsebina bučke strjuje, se določanje začne znova, vendar z večjo količino žveplove kisline (točka 3.4), kakor je navedeno v točki 5.1.
- 8.3 Pri proizvodih z nizko vsebnostjo dušika se lahko volumen žveplove kisline (točka 3.7), ki se doda v zbirno bučko, po potrebi zmanjša na 10 ml ali 15 ml, bučka pa se dopolni do 25 ml z vodo.
- 8.4 Pri redni analizi se lahko za določanje surovih beljakovin uporabi nadomestna analizna metoda, vendar je Kjeldahlova metoda, opisana v tem delu C, referenčna metoda. Za vsako matrico posebej je treba dokazati, da so rezultati, pridobljeni z nadomestno metodo (npr. DUMAS), enakovredni rezultatom, pridobljenim z referenčno metodo. V poročilu o analizi je treba navesti analizo metodo, uporabljeno za določanje surovih beljakovin, saj lahko rezultati, pridobljeni z nadomestno metodo, kljub potrditvi enakovrednosti, odstopajo od rezultatov, pridobljenih z referenčno metodo.

D. DOLOČANJE SEČNINE

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni sečnine, ki se uporablja kot krmni dodatek v krmi za prežvekovalce.

2. Načelo

Vzorec se suspendira v vodi s sredstvom za zbistritev. Suspenzija se filtrira. Doda se 4-dimetilaminobenzaldehid (4-DMAB), nato pa se določi vsebnost sečnine v filtratu z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 420 nm.

3. Reagenti

- 3.1 Raztopina 4-dimetilaminobenzaldehida: 1,6 g 4-DMAB se raztopi v 100 ml 96-odstotnega etanola in doda 10 ml klorovodikove kisline (ρ_{20} 1,19 g/ml). Ta reagent se lahko hrani največ dva tedna.
- 3.2 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 3 g led-ocetne kisline se raztopijo v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.3 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se raztopi v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.4 Aktivno oglje, ki ne absorbira sečnine (treba je preveriti).
- 3.5 Sečnina, 0,1-odstotna raztopina (m/v).

4. Naprava

- 4.1 Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.
- 4.2 Epruvete: 160 mm × 16 mm z brušenimi zamaški.
- 4.3 Spektrofotometer

5. Postopek

5.1 Analiza vzorca

2 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in skupaj z 1 g aktivnega oglja (točka 3.4) prenese v 500-mililitrsko merilno bučko. Doda se 400 ml vode in 5 ml raztopine Carrez I (točka 3.2), meša se približno 30 sekund in doda 5 ml raztopine Carrez II (točka 3.3). Meša se trideset minut v mešalcu. Dopolni se z vodo do oznake, pretrese in filtrira.

5 ml prozornega brezbarvnega filtrata se odstrani in prenese v epruvete z brušenimi zamaški, doda se 5 ml raztopine 4-DMAB (točka 3.1) ter premeša. Epruvete se postavijo v kopel z vodo pri 20 °C (+/- 4 °C). Po petnajstih minutah se izmeri optična gostota vzorčne raztopine s spektrofotometrom pri 420 nm. Rezultat se primerja z raztopino reagentov iz slepega preskusa.

5.2 Umeritvena krivulja

V 100-mililitrske merilne bučke se prenese 1, 2, 4, 5 in 10 ml raztopine sečnine (točka 3.5), nato pa se dopolnijo z vodo do oznake. Od vsake raztopine se odpipetira 5 ml, vsaki se doda 5 ml raztopine 4-DMAB (točka 3.1), homogenizira se in izmeri optična gostota, kakor je opisano zgoraj s primerjavo s kontrolno raztopino, ki vsebuje 5 ml 4-DMAB in 5 ml vode brez sečnine. Pripravi se umeritvena krivulja.

6. Izračun rezultatov

Količina sečnine v vzorcu se določi iz umeritvene krivulje.

Rezultat se izrazi v mg sečnine na kg vzorca.

7. Ocena metode

7.1 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, ki se izvedeta na istem vzorcu v istem laboratoriju in ju izvede isti izvajalec dejavnosti, ne sme presegati:

- pri 420 nm
 - 50 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine od 3 000 mg/kg do manj kot 5 000 mg/kg,
 - 25 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine od 5 000 mg/kg do manj kot 7 000 mg/kg,
 - 20 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine 7 000 mg/kg ali več;
- pri 435 nm
 - 40 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine od 3 000 mg/kg do manj kot 5 000 mg/kg;
 - 25 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine od 5 000 mg/kg do manj kot 9 000 mg/kg;
 - 5 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine 9 000 mg/kg ali več.

7.2 Obnovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki se izvedeta na istem vzorcu v različnih laboratorijih in/ali ju izvedejo različni izvajalci dejavnosti ne sme presegati:

- pri 420 nm
 - 3 000 mg/kg v absolutni vrednosti za vsebnosti sečnine od 3 000 mg/kg do manj kot 12 000 mg/kg,
 - 4 500 mg/kg v absolutni vrednosti za vsebnosti sečnine 12 000 mg/kg ali več;
- pri 435 nm
 - 50 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine od 3 000 mg/kg do manj kot 8 000 mg/kg,
 - 25 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti sečnine 8 000 mg/kg ali več.

8. **Rezultati medlaboratorijske študije**

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjava EU, v kateri je sodelovalo 18 laboratorijev. Analiziranih je bilo pet pozitivnih vzorcev krmnih mešanic za prežvekovalce (v tabelah 1 in 2 navedenih kot MAT) (ena analiza) v slepih dvojnih vzorcih, medtem ko je bil en slepi vzorec krmne mešanice za prežvekovalce analiziran enkrat.

Izračuni mejnih vrednosti za ponovljivost (r) in obnovljivost (R), kot je določeno v mednarodnih smernicah, so bili opravljeni po odstranitvi atipičnih vrednosti z analizo variance veljavnih vrednosti.

Izračunani podatki o učinkovitosti metode (ponovljivost, obnovljivost) so predstavljeni v naslednjih tabelah. Med rezultati vseh preskušanih vzorcih, vključno s slepim materialom, ni bilo nobenih lažno pozitivnih ali lažno negativnih.

Tabela 1

Značilnosti učinkovitosti metode za sečnino, izmerjeno pri $\lambda = 420$ nm v vseh materialih

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Govedo	Ovce	Ovce	Govedo
Ciljni masni delež (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Povprečni masni delež (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Standardni odklon obnovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Standardni odklon ponovljivosti s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Relativni standardni odklon obnovljivosti RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Relativni standardni odklon ponovljivosti RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Mejna vrednost obnovljivosti, R [$R = 2.8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Mejna vrednost ponovljivosti, r [$r = 2.8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabela 2

Značilnosti učinkovitosti metode za sečnino, izmerjeno pri $\lambda = 435$ nm v vseh materialih

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Govedo	Ovce	Ovce	Govedo
Ciljni masni delež (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Povprečni masni delež (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Standardni odklon obnovljivosti s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Standardni odklon ponovljivosti s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167

Relativni standardni odklon obnovljivosti RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativni standardni odklon ponovljivosti RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Mejna vrednost obnovljivosti, R [$R = 2.8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Mejna vrednost ponovljivosti, r [$r = 2.8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. Opombe

- 9.1 Če vsebnost sečnine presega 3 %, se vzorec zmanjša na 1 g ali se prvotna raztopina razredči, tako da v 500 ml ni več kot 50 mg sečnine.
- 9.2 Če je vsebnost sečnine nizka, se vzorec poveča, dokler je filtrat še prozoren in brezbarven.
- 9.3 Zgornji rezultati iz medlaboratorijskih preskušanj ne kažejo bistvene razlike pri natančnosti med sečnino, izmerjeno pri 420 nm, ali sečnino, izmerjeno pri 435 nm.

E. DOLOČANJE AMINOKISLIN (RAZEN TRIPTOFANA)

Analizne metode, ki se uporabljajo za določanje aminokislin (razen triptofana) so naslednje:

- EN ISO 13903 Krma – Določevanje aminokislin,
- EN ISO 17180 Živalska krma – Določevanje lizina, metionina in treonina v komercialnih aminokislinskih izdelkih in premiksah ⁽⁴⁾,
- analizna metoda, opisana v naslednjih točkah 1 do 10.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje prostih (sintetičnih in naravnih) in celotnih (vezanih s peptidi in prostih) aminokislin v posamičnih krmilih, krmnih mešanicah in premiksah, ki vsebujejo manj kot 10 % ⁽⁵⁾ vsake aminokisline, z uporabo analizatorja aminokislin. Uporablja se za naslednje aminokisline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, aspartat, glutaminsko kislino, glicin, histidin, izolevcin, levcin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin in valin.

Z metodo ni možno ločevati med različnimi solmi aminokislin ter med D in L oblikami aminokislin. Ne uporablja se za določanje triptofana ali hidroksi-analogov aminokislin.

2. Načelo

2.1 Proste aminokisline

Proste aminokisline se ekstrahirajo z razredčeno klorovodikovo kislino. Soekstrahirane dušikove makromolekule se oborijo s sulfosalicilno kislino in odstranijo s filtriranjem. Vrednost pH filtrirane raztopine se uravna na 2,20. Aminokisline se ločijo z ionskoizmenjevalno kromatografijo in določijo z reakcijo z ninhidrinom s fotometrično detekcijo pri 570 nm.

⁽⁴⁾ Analizna metoda, opredeljena v standardu EN 17180, se obravnava kot alternativna metoda, ki se uporablja za namene uradnega nadzora za določevanje aminokislin v krmi, ki vsebuje več kot 10 % aminokislin.

⁽⁵⁾ Ta metoda ni bila validirana v okviru medlaboratorijskega preskušanja za premikse, ki vsebujejo več kot 10 % krmnih dodatkov. Vendar se uporablja tudi za te matrikse z ustreznimi manjšimi spremembami, pod pogojem, da se nato validira interno. Za več informacij je na voljo povezava <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

2.2 Celotne aminokisline

Postopek se izbere glede na preiskovane aminokisline. Cist(e)in in metionin se morata pred hidrolizo oksidirati v cisteinsko kislino oz. metionin-sulfon. Tirozin se mora določiti v hidrolizatih neoksidiranih vzorcev. Vse druge aminokisline, navedene v točki 1 (Namen in področje uporabe), se lahko določajo v oksidiranem ali neoksidiranem vzorcu.

Oksidacijo izvedemo pri temperaturi 0 °C z mešanico peroksimravljinske kisline in fenola. Presežek oksidacijskega reagenta se razgradi z natrijevim disulfitom. Oksidiran ali neoksidiran vzorec se 23 ur hidrolizira s klorovodikovo kislino (točka 3.20). Vrednost pH hidrolizata se uravna na 2,20. Aminokisline se ločijo z ionskoizmenjevalno kromatografijo in določijo z reakcijo z ninhidrinom s fotometrično detekcijo pri 570 nm (440 nm za prolin).

3. Reagenti

Uporabiti je treba dvojno destilirano vodo ali vodo enakovredne kakovosti (prevodnost < 10 µS).

3.1 Vodikov peroksid, m (m/m) = 30 %.

3.2 Mravljinčna kislina, m (m/m) = 98 %-100 %.

3.3 Fenol.

3.4 Natrijev disulfit.

3.5 Natrijev hidroksid.

3.6 5-sulfosalicilna kislina dihidrat.

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

3.8 Tri-natrijev citrat dihidrat.

3.9 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).

3.10 Natrijev klorid.

3.11 Ninhidrin.

3.12 Petroleter, vrelišče 40 °C–60 °C.

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

3.14 Plinasti dušik (< 10 ppm kisika).

3.15 1-oktanol.

3.16 Aminokisline.

3.16.1 Standardne snovi aminokisline, navedene pod točko 1 (Namen in področje uporabe). Čiste spojine, ki ne vsebujejo kristalne vode. Pred uporabo se suši 1 teden pod vakuumom s P₂O₅ ali H₂SO₄.

3.16.2 Cisteinska kislina.

3.16.3 Metionin-sulfon.

3.17 Raztopina natrijevega hidroksida, c = 7,5 mol/l:

300 g NaOH (točka 3.5) se raztopi v vodi in dopolni z vodo do 1 litra.

3.18 Raztopina natrijevega hidroksida, c = 1 mol/l:

40 g NaOH (točka 3.5) se raztopi v vodi in dopolni z vodo do 1 litra.

3.19 Raztopina mravljinčne kisline in fenola:

889 g mravljinčne kisline (točka 3.2) se zmeša s 111 g vode ter se doda 4,73 g fenola (točka 3.3).

- 3.20 Hidrolizna mešanica, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, ki vsebuje 1 g fenola/l :
 1 g fenola (točka 3.3) se doda k 492 ml HCl (točka 3.7) in dopolni z vodo do 1 litra .
- 3.21 Mešanica ekstrakcije, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, ki vsebuje 2% tiodiglikola: $8,2 \text{ ml HCl}$ (točka 3.7) se razredči s približno 900 ml vode, doda se $20 \text{ ml tiodiglikola}$ (točka 3.9) in dopolni z vodo do 1 litra (točki 3.7 in 3.9 se ne smeta zmešati neposredno).
- 3.22 5-sulfosalicilna kislina, $\beta = 6 \%$:
 $60 \text{ g 5-sulfosalicilne kisline}$ (točka 3.6) se raztopi v vodi in dopolni z vodo do 1 litra .
- 3.23 Oksidacijska mešanica (peroksimravljinska kislina in fenol):
 $0,5 \text{ ml vodikovega peroksida}$ (točka 3.1) se zmeša s $4,5 \text{ ml raztopine mravljinčne kisline in fenola}$ (točka 3.19) v majhni čaši. Inkubira se 1 uro pri 20°C – 30°C , da nastane peroksimravljinska kislina, nato se ohladi v ledeni kopeli (15 min), preden se doda vzorcu.
Opozorilo: Izogibati se je treba stiku s kožo in nositi je treba zaščitna oblačila.
- 3.24 Citratni pufer, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
v približno 800 ml vode se raztopi $19,61 \text{ g natrijevega citrata}$ (točka 3.8), $5 \text{ ml tiodiglikola}$ (točka 3.9), 1 g fenola (točka 3.3) in $16,50 \text{ ml HCl}$ (točka 3.7). Vrednost pH se uravna na 2,20. Dopolni se z vodo do 1 litra .
- 3.25 Pufri za eluiranje, pripravljeni v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (točka 4.9).
- 3.26 Reagent ninhidrin, pripravljen v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (točka 4.9).
- 3.27 Standardne raztopine aminokislin. Te raztopine se hranijo pri temperaturi do 5°C .
- 3.27.1 Osnovna standardna raztopina aminokislin (točka 3.16.1).
 $C = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ za vsako v klorovodikovi kislini.
Lahko se priskrbi iz proste prodaje.
- 3.27.2 Osnovna standardna raztopina cisteinske kisline in metionin-sulfona, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$.
V litrski merilni bučki se raztopi $0,2115 \text{ g cisteinske kisline}$ (točka 3.16.2) in $0,2265 \text{ g metionin-sulfona}$ (točka 3.16.3) v citratnem pufru (točka 3.24) ter dopolni s citratnim pufrom do oznake. Hrani se največ 12 mesecev pri temperaturi do 5°C . Ta raztopina se ne uporablja, če osnovna standardna raztopina (točka 3.27.1) vsebuje cisteinsko kislino in metionin-sulfon.
- 3.27.3 Osnovna standardna raztopina internega standarda, npr. norlevcina, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.
V merilni bučki se raztopi $0,6560 \text{ g norlevcina}$ (točka 3.13) v citratnem pufru (točka 3.24) in dopolni s citratnim pufrom do 250 ml . Hrani se največ 6 mesecev pri temperaturi do 5°C .
- 3.27.4 Raztopina za umerjanje standardnih aminokislin, ki se uporablja s hidrolizati, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ za cisteinsko kislino in metionin-sulfon ter $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ za druge aminokisline. V 100-mililitrski čaši se raztopi $2,2 \text{ g natrijevega klorida}$ (točka 3.10) s $30 \text{ ml citratnega pufra}$ (točka 3.24). Dodajo se $4,00 \text{ ml osnovne standardne raztopine aminokisline}$ (točka 3.27.1), $4,00 \text{ ml osnovne standardne raztopine cisteinske kisline in metionin-sulfona}$ (točka 3.27.2) ter $0,50 \text{ ml osnovne standardne raztopine internega standarda}$ (točka 3.27.3), če se uporablja. Vrednost pH se uravna na 2,20 z natrijevim hidroksidom (točka 3.18).
Vsebina se prenese v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolni se s citratnim pufrom (točka 3.24) do oznake in premeša.
Hrani se največ 3 mesece pri temperaturi do 5°C .
Glej tudi opombe pod točko 9.1.
- 3.27.5 Raztopina za umerjanje standardnih aminokislin, ki se uporablja s hidrolizati, se pripravi v skladu s točko 5.3.3.1, za ekstrakte pa v skladu s točko 5.2. Raztopina za umerjanje se pripravi v skladu s točko 3.27.4, vendar brez natrijevega klorida.
Hrani se največ 3 mesece pri temperaturi do 5°C .

4. **Naprava**

- 4.1 100- ali 250-mililitrska bučka z okroglim dnom in povratnim hladilnikom.
- 4.2 100-mililitrska steklenica iz borosilikatnega stekla s pokrovčkom z navojem in ovita v gumo/teflon (npr. Duran, Schott) za uporabo v sušilniku.
- 4.3 Sušilnik s prisilnim prezračevanjem in regulatorjem temperature z natančnostjo, boljše od ± 2 °C.
- 4.4 pH meter (na tri decimalke).
- 4.5 Membranski filter (0,22 μ m).
- 4.6 Centrifuga.
- 4.7 Rotavapor.
- 4.8 Mehanični stresalnik ali magnetno mešalo.
- 4.9 Aminokislinski analizator ali HPLC-oprema z ionskoizmenjevalno kolono, pripravo za ninhidrin, derivatizacijo po koloni in fotometričnim detektorjem.

Kolona se napolni s smolo sulfoniranega polistirena, ki lahko loči aminokisline med seboj in od drugih materialov, ki vsebujejo ninhidrin. Črpalki s stabilnim tokom $\pm 0,5$ % zagotavljata tok v pufrski in ninhidrinski črti pri standardnem umerjanju in analizi vzorca.

Za nekatere aminokisline se lahko uporabi hidroliza v analizatorju, pri čemer je koncentracija natrija v hidrolizatu $c = 0,8$ mol/l in v hidrolizatu je vsa mravljinčna kislina, ki nastane pri oksidaciji. Druge metode ne zagotavljajo zadovoljive ločitve nekaterih aminokislin, če je v hidrolizatu preveč mravljinčne kisline in/ali visoka koncentracija natrijevih ionov. V tem primeru se volumen kisline po hidrolizi in pred uravnavanjem pH zmanjša z uparovanjem na približno 5 ml. Uparovanje se izvede pod vakuumom pri največ 40 °C.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava vzorca*

Vzorec se zdrobi, tako da lahko preide skozi 0,5 mm sito. Vzorce z visoko vlago je treba pred drobljenjem osušiti na zraku ali pri temperaturi, ki ne presega 50 °C, ali osušiti z zmrzovanjem. Vzorci z visoko vsebnostjo maščobe se pred drobljenjem ekstrahirajo s petroletrom (točka 3.12).

5.2 *Določanje prostih aminokislin*

Primerna količina (1 g–5 g) pripravljenega vzorca (točka 5.1) se natehta na 0,2 mg natančno in prenese v erlenmajerico, temu pa se doda 100,0 ml mešanice ekstrakcije (točka 3.21). Z mehaničnim stresalnikom ali magnetnim mešalom (točka 4.8) se mešanica stresa 60 minut. Pusti se, da se usedlina usede na dno, in odpipetira 10,0 ml supernatanta v 100-mililitrsko čašo.

Med mešanjem se doda 5,0 ml raztopine sulfosalicilne kisline (točka 3.22) in 5 minut nadaljuje z mešanjem s pomočjo magnetnega mešala. Supernatant se filtrira ali centrifugira, da se odstrani ves precipitat. 10,0 ml te raztopine se prenese v 100-mililitrsko čašo in pH uravnava na 2,20 z raztopino natrijevega hidroksida (točka 3.18), s citratnim pufrom (točka 3.24) se prenese v merilno bučko ustreznega volumna in dopolni s pufrsko raztopino (točka 3.24) do oznake.

Če se uporablja interni standard, se za vsakih 100 ml končne raztopine doda 1,00 ml internega standarda (točka 3.27.3) ter dopolni s pufrsko raztopino (točka 3.24) do oznake.

Nadaljuje se s kromatografijo v skladu s točko 5.4.

Če se ekstrakti ne pregledajo isti dan, se morajo hraniti pri temperaturi do 5 °C.

5.3 Določanje celotnih aminokislin

5.3.1 Oksidacija

0,1 g–1 g pripravljenega vzorca (točka 5.1) se natehta na 0,2 mg natančno in prenese v:

- 100-mililitrsko bučko z okroglim dnom (točka 4.1) za odprto hidrolizo (točka 5.3.2.3) ali
- 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom (točka 4.1), če je zahtevana nizka koncentracija natrija (točka 5.3.3.1), ali
- 100-mililitrsko steklenico s pokrovčkom z navojem (točka 4.2) (za zaprto hidrolizo točka 5.3.2.4).

V natehtanem vzorčenem deležu mora biti vsebnost dušika približno 10 mg, vsebnost vlage pa ne sme preseči 100 mg.

Bučka/steklenica se postavi v ledeno kopel in ohladi na 0 °C, doda se 5 ml oksidacijske mešanice (točka 3.23) in meša s stekleno lopatico z ukrivljeno konico. Bučka/steklenica z lopatico se nepredušno zapre s filmom, ledena kopel, ki vsebuje nepredušno zaprto posodo, pa se postavi v hladilnik s temperaturo 0 °C in pusti 16 ur. Po 16 urah se posoda vzame iz hladilnika, presežni oksidacijski reagent pa se razgradi z dodatkom 0,84 g natrijevega disulfita (točka 3.4).

Nadaljuje se s točko 5.3.2.1.

5.3.2 Hidroliza

5.3.2.1 Hidroliza oksidiranih vzorcev

Oksidiranemu vzorcu, pripravljenemu v skladu s točko 5.3.1, se doda 25 ml hidrolizne mešanice (točka 3.20), pri čemer je treba pazljivo sprati kakršne koli ostanke vzorca s stene posode in lopatice.

Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.2.3 ali 5.3.2.4, odvisno od uporabljenega postopka hidrolize.

5.3.2.2 Hidroliza neoksidiranih vzorcev

V 100- ali 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom (točka 4.1) ali 100-mililitrsko steklenico s pokrovčkom z navojem (točka 4.2) se natehta 0,1 g–1 g pripravljenega vzorca (točka 5.1) na 0,2 mg natančno. V natehtanem vzorčenem deležu mora biti vsebnost dušika približno 10 mg. Pazljivo se doda 25 ml hidrolizne mešanice (točka 3.20) in zmeša z vzorcem. Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.2.3 ali 5.3.2.4.

5.3.2.3 Odprta hidroliza

Mešanici v bučki (pripravljeni v skladu s točko 5.3.2.1 ali 5.3.2.2) se dodajo 3 steklene kroglice, nato se pusti vreti z neprestanim mehurčenjem pri povratnem toku 23 ur. Po zaključku hidrolize se kondenzator spere s 5 ml citratnega puфра (točka 3.24). Bučka se odstrani in ohladi v ledeni kopeli.

Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.3.

5.3.2.4 Zaprta hidroliza

Steklenica, ki vsebuje mešanico, pripravljeno v skladu s točko 5.3.2.1 ali 5.3.2.2, se postavi v sušilnik (točka 4.3) pri 110 °C. V prvi uri se za preprečitev povečanja tlaka (zaradi nastanka plinastih snovi) in eksplozije pokrovček z navojem postavi čez vrh steklenice. Steklenica se ne sme zapreti s pokrovčkom. Po eni uri se steklenica zapre s pokrovčkom in pusti v sušilniku (točka 4.3) 23 ur. Po zaključku hidrolize se steklenica odstrani iz sušilnika, pokrovček steklenice se pazljivo odpre, steklenica pa položi v ledeno kopel. Pusti se, da se ohladi.

Odvisno od postopka za uravnavanje pH (točka 5.3.3) se vsebina steklenice z uporabo citratnega puфра (točka 3.24) prenese v 250-mililitrsko čašo ali 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom.

Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.3.

5.3.3 Uravnavanje pH

Glede na odstopanje analizatorja aminokislin (točka 4.9) za natrij se za uravnavanje pH nadaljuje v skladu točko 5.3.3.1 ali 5.3.3.2.

5.3.3.1 Kromatografski sistemi (točka 4.9), pri katerih je zahtevana nizka koncentracija natrija

Ko se uporabljajo analizatorji aminokislin, pri katerih je zahtevana nizka koncentracija natrija (ko je treba zmanjšati volumen kisline), je priporočljivo uporabiti raztopino internega osnovnega standarda (točka 3.27.3).

V tem primeru se hidrolizatu pred uparevanjem dodata 2,00 ml raztopine internega osnovnega standarda (točka 3.27.3).

Hidrolizatu, pridobljenemu v skladu s točko 5.3.2.3 ali 5.3.2.4, se dodata 2 kapljici 1-oktanola (točka 3.15).

Z rotavaporjem (točka 4.7) se pod vakuumom pri 40 °C volumen zmanjša na 5 ml–10 ml. Če se volumen nenamerno zmanjša na manj kot 5 ml, se mora hidrolizat izločiti in analiza začeti znova.

Vrednost pH se uravna na 2,20 z raztopino natrijevega hidroksida (točka 3.18), nato pa se nadaljuje v skladu s točko 5.3.4.

5.3.3.2 Za vse druge analizatorje aminokislin (točka 4.9)

Hidrolizati, pridobljeni v skladu s točko 5.3.2.3 ali 5.3.2.4, se delno nevtralizirajo, tako da se med mešanjem pazljivo doda 17 ml raztopine natrijevega hidroksida (točka 3.17), pri čemer se mora ohraniti temperatura pod 40 °C.

Pri sobni temperaturi se pH uravna na 2,20 z raztopino natrijevega hidroksida (točka 3.17) in nato raztopino natrijevega hidroksida (točka 3.18). Nadaljuje se v skladu s točko 5.3.4.

5.3.4 Vzorčna raztopina za kromatografijo

Hidrolizat (točka 5.3.3.1 ali 5.3.3.2), uravnan na pH, se s citratnim pufrom (točka 3.24) prenese v 200-mililitrsko merilno bučko in dopolni s pufrom (točka 3.24) do oznake.

Če interni standard še ni bil uporabljen, se dodata 2,00 ml internega standarda (točka 3.27.3), nato pa se dopolni s citratnim pufrom (točka 3.24) do oznake. Temeljito se premeša.

Nadaljuje se s kromatografijo (točka 5.4).

Če se vzorčne raztopine ne pregledajo še isti dan, se morajo shraniti pri temperaturi pod 5 °C.

5.4 Kromatografija

Pred kromatografijo mora biti temperatura ekstrakta (točka 5.2) ali hidrolizata (točka 5.3.4) enaka sobni temperaturi. Mešanica se stresa, primerna količina pa se filtrira skozi membranski filter 0,22 µm (točka 4.5). S to bistro raztopino se opravi ionskaizmenjevalna kromatografija z analizatorjem aminokislin (točka 4.9).

Vbrizgavanje je lahko ročno ali avtomatično. Pomembno je, da se ista količina raztopine ($\pm 0,5$ %) doda koloni za analizo standardov in vzorcev, razen ko se uporablja interni standard, ter da je razmerje med natrijem in aminokislino v standardnih in vzorčnih raztopinah takšno, kot se uporablja običajno.

Na splošno je pogostost umerjanja odvisna od stabilnosti reagenta ninhidrina in analiznega sistema. Standard ali vzorec se razredči s citratnim pufrom (točka 3.24), da se doseže površina vrha standarda, ki je 30 %–200 % površine vrha aminokislin v vzorcu.

Kromatografija aminokislin se nekoliko razlikuje glede na vrsto uporabljenega analizatorja in smole. Izbrani sistem mora imeti možnost ločitve aminokislinske mešanice od materialov, ki vsebujejo ninhidrin. V delovnem območju se mora kromatografski sistem odzivati linearno na spremembe količin aminokislin, dodanih koloni.

Pri kromatografiji se uporabljajo spodaj navedena razmerja med najnižimi in najvišjimi vrednostmi, ko se analizira ekvimolarna raztopina (aminokislin, ki se določajo). Ekvimolarna raztopina mora vsebovati vsaj 30 % največje vsebnosti vsake aminokisline, ki se lahko natančno izmeri s sistemom za analizo aminokislin (točka 4.9).

Za ločevanje treonina od serina razmerje med najnižjo in najvišjo vrednostjo za aminokislino z nižjo vrednostjo izmed dveh prekrivajočih se aminokislin na kromatogramu ne sme presegati 2:10. (Če se določajo le cistein, metionin, treonin in lizin, bo neustrezna ločitev od sosednjih vrhov negativno vplivala na določanje.) Za vse druge aminokisline mora biti ločevanje boljše od 1:10.

Sistem mora zagotavljati, da se lizin loči od „lizinskih artefaktov“ in ornitina.

6. Izračun rezultatov

Za vsako posamezno aminokislino se izračuna površina vrha vzorca in standarda ter količina (X), izražena v g aminokislin na kg vzorca.

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

Če se uporablja interni standard, se pomnoži z: $\frac{D}{C}$

A = površina vrha hidrolizata ali ekstrakta

B = površina vrha standardne raztopine za umerjanje

C = površina vrha hidrolizata ali ekstrakta kot internega standarda

D = površina vrha standardne raztopine za umerjanje kot internega standarda

M = molska masa aminokisline, ki se določa

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

m = masa vzorca v gramih (popravljen na prvotno maso, če je vzorec posušen ali razmaščen)

V = ml celotnega hidrolizata (točka 5.3.4) ali izračunani celotni volumen razredčitve ekstrakta (točka 6.1) v ml

Cistin in cistein se določata kot cisteinska kislina v hidrolizatih oksidiranega vzorca, vendar se izračunata kot cistin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol) z uporabo molske mase 120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol).

Metionin se določa kot metionin-sulfon v hidrolizatih oksidiranega vzorca, vendar se izračuna kot metionin, pri čemer se uporabi molska masa metionina: 149,21 g/mol.

Dodani prosti metionin se določa po ekstrakciji kot metionin, za izračun pa se uporabi ista molska masa.

6.1 Celotni volumen razredčitve ekstraktov (F) za določanje prostih aminokislin (točka 5.2) se izračuna:

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

V = volumen končnega ekstrakta

7. Ocena metode

Metoda je bila preskušena v mednarodni medlaboratorijski primerjavi, ki je bila izvedena leta 1990 s štirimi različnimi vrstami krme (mešana prašičja krma, mešanica za pitovne piščance, beljakovinski koncentrat, premiks).

Opomba: Metoda je bila preskušena v drugi mednarodni medlaboratorijski študiji leta 2003 z uporabo slepih dvojnih parov vzorcev krme za pitanje brojlerjev, starterjev za brojlerje, koruze, ribje in perutninske moke. Za podrobnosti glej standard EN ISO 13903.

Rezultati primerjave iz leta 1990, brez izjem, s srednjimi vrednostmi in standardnimi odmiki so prikazani v tabeli v tej točki:

Srednje vrednosti v g/kg

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

n = število sodelujočih laboratorijev

7.1 Ponovljivost

Ponovljivost, izražena kot „standardni odklon v laboratoriju“, za primerjavo iz predhodne tabele, je prikazana v spodnji tabeli:

Koeficient variacije (%) za ponovljivost (CV_r)

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

n = število sodelujočih laboratorijev

7.2 Obnovljivost

Rezultati zgoraj navedene primerjave, izraženi kot standardni odklon med laboratoriji, so prikazani v spodnji tabeli:

Koeficient variacije (%) za obnovljivost (CV_r)

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Mešana prašičja krma	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Krmna mešanica za brojlerje	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Beljakovinski koncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15

Premiks	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16
---------	---------------	---	---------------	---------------

n = število sodelujočih laboratorijev

8. Uporaba referenčnih materialov

Pravilna uporaba metode se preveri s ponovljenimi merjenji na potrjenih referenčnih materialih, kadar so na voljo. Priporočeno je umerjanje s potrjeno raztopino za umerjanje aminokislin.

9. Opombe

9.1 Zaradi razlik med analizatorji aminokislin se kot smernica obravnavajo končne koncentracije raztopin standardnih aminokislin za umerjanje (glej točki 3.27.4 in 3.27.5) in hidrolizata (glej točko 5.3.4).

Za vse aminokisline je treba preveriti območje naprave, v katerem je odziv linearen.

Standardna raztopina se razredči s citratnim pufrom, da je površina vrha na sredini tega območja.

9.2 Kadar se za analizo hidrolizatov uporablja oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, se morajo eksperimentalni pogoji optimizirati v skladu s priporočili proizvajalca.

9.3 Pri uporabi metode za krmne mešanice ali premikse, ki vsebujejo več kot 1 % klorida (koncentrat, mineralna krma, dopolnilna krmna mešanica), se lahko pojavi pre nizka vrednost vsebnosti metionina in zato se izvede posebna obdelava.

10. Izvedbena merila

Z obdelavo rezultatov (razen za tirozin) iz dveh medlaboratorijskih študij (iz leta 1990, navedena v zgornji točki 7, in iz leta 2005, navedena v standardu EN/ISO 13903) so bila zagotovljena naslednja merila za ponovljivost in obnovljivost. Vrednosti, ki izhajajo iz teh dveh medlaboratorijskih preskusov, mogoče ne bodo ustrezale razponom koncentracij in matriksom, ki se od danih razlikujejo.

10.1 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, ki se izvedeta na istem vzorcu v istem laboratoriju in ju izvede isti izvajalec dejavnosti, ne sme presegati:

- 6 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru glicina, alanina, lizina, prolina, glutaminske kisline, izolevcina in histidina;
- 8 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru treonina, fenilalanina, metionina, asparaginske kisline in levcina;
- 10 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru arginina in valina;
- 12 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino serin;
- 15 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino cist(e)in.

10.2 Obnovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki se izvedeta na istem vzorcu v različnih laboratorijih in/ali ju izvedejo različni izvajalci dejavnosti ne sme presegati:

- 15 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru glicina, alanina in treonina,
- 20 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru lizina, prolina, fenilalanina, metionina in asparaginske kisline,
- 22 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru glutaminske kisline in levcina,
- 27 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino arginin,
- 32 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino izolevcin,

- 35 % relativno glede na višjo vrednost za celotne aminokisline v primeru valina in serina,
- 40 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino histidin,
- 50 % relativno glede na višjo vrednost za celotno aminokislino cist(e)in.

F. DOLOČANJE TRIPTOFANA

Analizne metode, ki se uporabljajo za določanje triptofana so naslednje:

- EN ISO 13904 Krma – Določevanje triptofana;
- analizna metoda, opisana v naslednjih točkah 1 do 9.

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje celotnega in prostega triptofana v krmi. Ne omogoča pa ločevanja med oblikama D in L.

2. **Načelo**

Za določanje celotnega triptofana se vzorec hidrolizira pri bazičnih pogojih z nasičeno raztopino barijevega hidroksida in 20 ur segreva do 110 °C. Po hidrolizi se doda interni standard.

Za določanje prostega triptofana se vzorec ekstrahira pri rahlo kislih pogojih v prisotnosti internega standarda.

Triptofan in interni standard v hidrolizatu ali ekstraktu se določata s HPLC s fluorescenčno detekcijo.

3. **Reagenti**

- 3.1 Uporabljati je treba dvakrat destilirano vodo ali vodo enake kakovosti (prevodnost < 10 µS/cm).
- 3.2 Standardna snov: triptofan (čistoča/vsebnost ≥ 99 %), osušen pod vakuumom nad fosforjevim pentoksidom.
- 3.3 Snov, ki je interni standard: α-metil-triptofan (čistoča/vsebnost ≥ 99 %), osušen pod vakuumom nad fosforjevim pentoksidom.
- 3.4 Barijev hidroksid oktahidrat (paziti je treba, da Ba(OH)₂ · 8 H₂O ni pretirano izpostavljen zraku, da se ne bi tvoril BaCO₃, ki lahko moti določanje) (glej točko 9.3).
- 3.5 Natrijev hidroksid.
- 3.6 Ortofosforna kislina, m (m/m) = 85 %.
- 3.7 Klorovodikova kislina, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8 Metanol, za HPLC.
- 3.9 Petroleter, vrelišče 40 °C–60 °C.
- 3.10 Raztopina natrijevega hidroksida, c = 1 mol/l:
40,0 g NaOH (točka 3.5) se raztopi v vodi in dopolni z vodo do 1 litra (točka 3.1).
- 3.11 Klorovodikova kislina, c = 6 mol/l:
492 ml HCl (točka 3.7) se dopolni z vodo do 1 litra.
- 3.12 Klorovodikova kislina, c = 1 mol/l:
82 ml HCl (točka 3.7) se dopolni z vodo do 1 litra.

- 3.13 Klorovodikova kislina, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
8,2 ml HCl (točka 3.7) se dopolni z vodo do 1 litra.
- 3.14 Ortofosforna kislina, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
34 ml ortofosforne kisline (točka 3.6) se dopolni z vodo (3.1) do 1 litra.
- 3.15 Koncentrirana raztopina triptofana (točka 3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
v 500-mililitrski merilni bučki se raztopi 0,2553 g triptofana (točka 3.2) v klorovodikovi kislini (točka 3.13) in dopolni s klorovodikovo kislino (točka 3.13) do oznake. Pri $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se shrani največ 4 tedne.
- 3.16 Koncentrirana raztopina internega standarda, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
v 500-mililitrski merilni bučki se raztopi 0,2728 g α -metil-triptofana (točka 3.3) v klorovodikovi kislini (točka 3.13) in dopolni se s klorovodikovo kislino (točka 3.13) do oznake. Pri $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se shrani največ 4 tedne.
- 3.17 Standardna raztopina triptofana in internega standarda za umerjanje:
pripravi se 2,00 ml koncentrirane raztopine triptofana (točka 3.15) in 2,00 ml koncentrirane raztopine internega standarda (α -metil-triptofan) (točka 3.16). Razredči se z vodo (točka 3.1) in metanolom (točka 3.8) na približno enaka volumna in na približno enako koncentracijo metanola (10 %–30 %) kot pri končnem hidrolizatu.
Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.
Med pripravo jo je treba zaščititi pred neposredno sončno svetlobo.
- 3.18 Ocetna kislina.
- 3.19 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol.
- 3.20 Etanolamin, $m \text{ (m/m)} > 98 \text{ } \%$.
- 3.21 1 g 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanola (točka 3.19) se raztopi v 100 ml metanola (točka 3.8).
- 3.22 Mobilna faza za HPLC: 3,00 g očetne kisline (točka 3.18) in 900 ml vode (točka 3.1) + 50,0 ml raztopine (točka 3.21) 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanola (točka 3.19) v metanolu (točka 3.8) (1 g/100 ml). Naravnamo pH na 5,00 z uporabo etanolamina (točka 3.20). Dopolni se z vodo do 1 000 ml (točka 3.1).
4. **Naprava**
- 4.1 Oprema HPLC s spektrofotometričnim detektorjem.
- 4.2 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 125 mm x 4 mm C_{18} , polnitev 3 μm ali enakovredna.
- 4.3 pH meter.
- 4.4 Bučka iz polipropilena, volumna 125 ml, s širokim vratom in pokrovčkom z navojem.
- 4.5 Membranski filter, 0,45 μm .
- 4.6 Avtoklav, $110 (\pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,4 (\pm 0,1) \text{ bar}$.
- 4.7 Mehanični stresalnik ali magnetno mešalo.
- 4.8 Vorteks mešalnik.

5. Postopek

5.1 Priprava vzorcev

Vzorec se zdrobi, tako da lahko preide skozi 0,5 mm sito. Vzorce z visoko vlago je treba pred drobljenjem osušiti na zraku ali pri temperaturi, ki ne presega 50 °C, ali osušiti z zmrzovanjem. Vzorci z visoko vsebnostjo maščobe se pred drobljenjem ekstrahirajo s petroletrom (točka 3.9).

5.2 Določanje prostega triptofana (ekstrakt)

Primerna količina (1 g–5 g) pripravljenega vzorca (točka 5.1) se natehta na 1 mg natančno in prenese v erlenmajerico. Doda se 100,0 ml klorovodikove kisline (točka 3.13) in 5,00 ml koncentrirane raztopine internega standarda (točka 3.16). Z mehničnim stresalnikom ali magnetnim mešalom (točka 4.7) se stresa ali meša 60 minut. Pusti se, da se usedlina usede na dno, nato pa se odpipetira 10,0 ml supernatanta v čašo. Doda se 5 ml ortofosforne kisline (točka 3.14). Vrednost pH se uravna na 3 z natrijevim hidroksidom (točka 3.10). Doda se dovolj metanola (točka 3.8), da se v končnem volumnu dobi koncentracija metanola med 10 % in 30 %. Prenese se v merilno bučko primernega volumna in razredči z vodo na volumen, potreben za kromatografijo (približno enak volumen kot pri standardni raztopini za umerjanje (točka 3.17)).

Pred vbrizganjem na HPLC kolono se nekaj ml raztopine prefiltrira skozi 0,45 µm membranski filter (točka 4.5). Nadaljuje se s kromatografijo v skladu s točko 5.4.

Standardna raztopina in ekstrakti se zaščitijo pred neposredno sončno svetlobo. Če ni možno analizirati ekstraktov istega dne, se lahko hranijo največ 3 dni pri 5 °C.

5.3 Določanje celotnega triptofana (hidrolizat)

0,1 g–1 g pripravljenega vzorca (točka 5.1) se natehta na 0,2 mg natančno in prenese v bučko iz polipropilena (točka 4.4). Vsebnost dušika v natehanem delu vzorca je približno 10 mg. Doda se 8,4 mg barijevega hidroksid oktahidrata (točka 3.4) in 10 ml vode. Meša se na vorteks mešalniku (točka 4.8) ali z magnetnim mešalom (točka 4.7). S teflonom prevlečeni magnet pustimo v mešanici. Stene posode se sperejo s 4 ml vode. Zapre se s pokrovčkom z navojem, bučka pa se rahlo zapre. Prenese se v avtoklav (točka 4.6), kjer je vrela voda, in pusti v pari 30–60 minut. Zapre se avtoklav in 20 ur avtoklavira pri 110 (± 2) °C.

Pred odprtjem avtoklava se temperatura zmanjša nekoliko pod 100 °C. Da se prepreči kristalizacija Ba(OH)₂ · 8 H₂O, se topli mešanici doda 30 ml vode sobne temperature. Rahlo se pretresa ali meša. Doda se 2,00 ml koncentrirane raztopine internega standarda (α-metil-triptofana) (točka 3.16). Posode se 15 minut hladijo na vodni/ledeni kopeli.

Nato se doda 5 ml ortofosforne kisline (točka 3.14). Posoda se zadrži v hladilni kopeli, med mešanjem nevtralizira s HCl (točka 3.11), pH pa se s HCl (točka 3.12) uravna na 3,0. Doda se dovolj metanola, da se v končnem volumnu dobi koncentracija metanola med 10 % in 30 %. Prenese se v merilno bučko primernega volumna in razredči z vodo do volumna, potrebnega za kromatografijo (na primer 100 ml). Dodatek metanola ne povzroči obarjanja.

Pred vbrizganjem na HPLC kolono se nekaj ml raztopine prefiltrira skozi 0,45 µm membranski filter (točka 4.5). Nadaljuje se s kromatografijo v skladu s točko 5.4.

Standardna raztopina in hidrolizati se zaščitijo pred neposredno sončno svetlobo. Če ni možno analizirati ekstraktov istega dne, se lahko hranijo največ 3 dni pri 5 °C.

5.4 Določanje s HPLC

Za izokratsko eluiranje se lahko kot smernica uporabljajo naslednji pogoji; lahko se uporabljajo tudi drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate (glej tudi točki 9.1 in 9.2).

Tekočinska kromatografija (točka 4.2):	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , polnitev 3 µm alienakovredna kolona
Temperatura kolone:	sobna temperatura
Mobilna faza (točka 3.22):	3,00 g očetne kisline (točka 3.18) + 900 ml vode (točka 3.1) + 50,0 ml raztopine (točka 3.21) 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanola (točka 3.19) v metanolu (točka 3.8) (1 g/100 ml). Vrednost pH se uravna na 5,00 z uporabo etanolamina (točka 3.20). Dopolni se z vodo do 1 000 ml (točka 3.1).
Hitrost pretoka:	1 ml/min
Skupni čas izvedbe:	približno 34 min
Valovna dolžina detektorja:	ekscitacija: 280 nm, emisija: 356 nm
Vbrizgani volumen	20 µl

6. Izračun rezultatov

Količina triptofana (X), izražena v g na 100 g vzorca, se izračuna po naslednji formuli:

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

A =	površina vrha internega standarda, standardne raztopine za umerjanje (3.17)
B =	površina vrha triptofana, ekstrakta (točka 5.2) ali hidrolizata (točka 5.3)
V ₁ =	volumen, v ml (2 ml), koncentrirane raztopine triptofana (točka 3.15), dodane raztopini za umerjanje (točka 3.17)
c =	koncentracija, v µmol/ml (= 2,50), koncentrirane raztopine triptofana (točka 3.15), dodane raztopini za umerjanje (točka 3.17)
V ₂ =	volumen, v ml, koncentrirane raztopine internega standarda (točka 3.16), dodane pri ekstrakciji (točka 5.2) (= 5,00 ml) ali hidrolizatu (točka 5.3) (= 2,00 ml)
C =	površina vrha internega standarda, ekstrakta (točka 5.2) ali hidrolizata (točka 5.3)
D =	površina vrha triptofana, standardne raztopine za umerjanje (točka 3.17)
V ₃ =	volumen, v ml (= 2,00 ml), koncentrirane raztopine internega standarda (točka 3.16), dodane standardni raztopini za umerjanje (točka 3.17)
m =	masa vzorca v g (popravljen na prvotno maso, če je vzorec posušen in/ali razmaščen)
M =	molska masa triptofana (= 204,23 g/mol)

7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % relativno glede na najvišji rezultat.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirana je bila medlaboratorijska študija EU (četrti medlaboratorijski primerjava), pri kateri je 12 laboratorijev analiziralo tri vzorce, da se potrdi metoda za hidrolizo. Vsak vzorec je bil analiziran petkrat. Rezultati so navedeni v spodnji tabeli:

	Vzorec 1 Prašičja krma	Vzorec 2 Prašičja krma z dodanim L-triptofanom	Vzorec 3 Koncentrat prašičje krme
L	12	12	12
n	50	55	50
Srednja vrednost [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 = število laboratorijev, ki so predložili rezultate

n = število pridobljenih posameznih rezultatov, po izločitvi izjem (identificiranih s preskusom za izjeme po Cochranu in Dixonu)

s_r = standardni odmik ponovljivosti

S_R = standardni odmik obnovljivosti

r = ponovljivost

R = obnovljivost

CV_r = koeficient variacije ponovljivosti v %

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti v %

Organizirana je bila še ena medlaboratorijska študija EU (tretja medlaboratorijska primerjava), v kateri je 13 laboratorijev analiziralo dva vzorca, da se potrdi metoda za ekstrakcijo prostega triptofana. Vsak vzorec je bil analiziran petkrat. Rezultati so navedeni v spodnji tabeli:

	Vzorec 4 Mešanica pšenice in soje	Vzorec 5 Mešanica pšenice in soje (= vzorec 4) z dodanim triptofanom (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Srednja vrednost [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 =	število laboratorijev, ki so predložili rezultate
n =	število pridobljenih posameznih rezultatov, po izločitvi izjem (identificiranih s preskusom za izjeme po Cochranu in Dixonu)
s _r =	standardni odmik ponovljivosti
S _R =	standardni odmik obnovljivosti
r =	ponovljivost
R =	obnovljivost
CV _r =	koeficient variacije ponovljivosti v %
CV _R =	koeficient variacije obnovljivosti v %

Organizirana je bila še ena medlaboratorijska študija EU, v kateri je do 7 laboratorijev analiziralo štiri vzorce, da se potrdi metoda za hidrolizo triptofana. Rezultati so v spodnji tabeli. Vsak vzorec je bil analiziran petkrat.

	Vzorec 1 Mešana prašičja krma (CRM 117)	Vzorec 2 Ribja moka z nizko vsebnostjo maščob (CRM 118)	Vzorec 3 Sojina moka (CRM 119)	Vzorec 4 Posneto mleko v prahu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Srednja vrednost [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 =	število laboratorijev, ki so predložili rezultate
n =	število pridobljenih posameznih rezultatov, po izločitvi izjem (identificiranih s preskusom za izjeme po Cochranu in Dixonu)
s _r =	standardni odmik ponovljivosti
S _R =	standardni odmik obnovljivosti
r =	ponovljivost
R =	obnovljivost
CV _r =	koeficient variacije ponovljivosti v %
CV _R =	koeficient variacije obnovljivosti v %

9. Opombe

9.1 Ločevanje triptofana in α-metil-triptofana lahko izboljšajo naslednji posebni kromatografski pogoji.

Izokratsko eluiranje, ki mu sledi gradientno čiščenje kolone:

Kolona za tekočinsko kromatografijo:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , polnitev 5 µm ali enakovredna	
Temperatura kolone:	32 °C	
Mobilna faza:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /Metanol, 95+5 (V+V)	
	B: Metanol	
Gradientni 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
Hitrost pretoka:	1,2 ml/min	
Skupni čas izvedbe:	približno 33 min	

- 9.2 Kromatografija se spreminja glede na vrsto HPLC in uporabljeni material za polnitev kolone. Izbrani sistem mora zagotavljati ločevanje bazne linije triptofana in internega standarda. Poleg tega je pomembno, da se produkti razgradnje dobro ločijo od triptofana in internega standarda. Izvede se postopek s hidrolizatom brez internega standarda, da se preveri bazna linija internega standarda za nečistoče. Pomembno je, da je čas izvedbe dovolj dolg, da se eluirajo vsi produkti razgradnje, sicer lahko zapoznili vrhovi eluiranja motijo nadaljnje kromatografiranje.

Kromatografski sistem se v delovnem območju odziva linearno. Linearni odziv se izmeri s konstantno (običajno) koncentracijo internega standarda in različnimi koncentracijami triptofana. Zelo pomembno je, da so velikosti vrhov triptofana in internega standarda v linearnem območju HPLC/fluorescenčnega sistema. Če so vrhovi triptofana in/ali internega standarda prenizki ali previsoki, se analiza ponovi z drugačno količino vzorca in/ali drugačnim končnim volumnom.

9.3 Barijev hidroksid

Topnost barijevega hidroksida se s staranjem zmanjša. Posledica tega je motna raztopina za določitev HPLC, kar lahko povzroči nizke rezultate za triptofan.

G. DOLOČANJE SUROVIH OLJ IN MAŠČOB

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje vsebnosti surovih olj in maščob v krmi.

Vrsta in sestava krme ter namena izvajanja analize vplivata na uporabo spodaj opisanih postopkov.

Za določanje vsebnosti surovih olj in maščob v oljnih semenih in oljnatem sadju ter v krmi, v kateri je vsebnost surovih olj/maščob večja od 15 %, bi bilo treba ekstrakcijo opraviti s postopkom A, ponovno ekstrakcijo pa s postopkom B (točka 5.3).

1.1 Postopek A – Surova olja in maščobe, ki se ekstrahirajo neposredno

Ta metoda se uporablja za posamična krmila rastlinskega izvora, razen tistih, ki so zajeta v področje uporabe postopka B.

1.2 Postopek B – Celotna surova olja in maščobe

Ta metoda se uporablja za posamična krmila živalskega izvora in za vse krmne mešanice. Uporablja se za vsa posamična krmila, iz katerih ni mogoče povsem ekstrahirati olj in maščob brez predhodne hidrolize (npr. gluten, kvasovke, krompirjeve beljakovine in proizvodi, pri katerih se izvaja ekstrudiranje, kosmičenje in segrevanje).

1.3 Razlaga rezultatov

Vedno kadar je rezultat pri postopku B višji od rezultata pri postopku A, se kot prava vrednost sprejme rezultat, dobljen pri postopku B.

2. Načelo

2.1 Postopek A

Vzorec se ekstrahira s petroletrom. Topilo se oddestilira, ostanek pa osuši in stehta.

2.2 Postopek B

Vzorec se med segrevanjem obdela s klorovodikovo kislino. Mešanica se ohladi in filtrira. Ostanek se spere in osuši, nato pa se izvede določanje v skladu s postopkom A.

3. Reagenti

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

3.2 Natrijev sulfat, brezvodni.

3.3 Klorovodikova kislina, c = 3 mol/l.

3.4 Filtracijsko sredstvo, npr. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Naprava

4.1 Naprava za ekstrakcijo. Če je opremljena s sifonom (naprava Soxhlet), je hitrost povratnega toka približno 10 ciklov na uro; če ni opremljena s sifonom, je hitrost povratnega toka približno 10 ml na minuto.

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

4.3 Sušilnik, vakuumski, nastavljen na 75 °C ± 3 °C, ali zračni, nastavljen na 100 °C ± 3 °C.

5. Postopek

5.1 Postopek A (glej točko 8.1)

5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno, prenese v kartušo za ekstrakcijo (točka 4.2) in pokrije s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščobe.

Kartuša se postavi v ekstraktor (točka 4.1) in šest ur ekstrahira s petroletrom (točka 3.1). Ekstrakt petroletra se zbere v suho stehtano bučko, v kateri so delci plovca ⁽⁶⁾.

Topilo se oddestilira. Ostanek se osuši tako, da se bučka za uro in pol postavi v sušilnik (točka 4.3). Pusti se, da se ohladi v eksikatorju, in stehta. Ponovno se suši 30 minut, da se zagotovi ohranitev konstantne mase olj in maščob (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ne sme presegati 1 mg).

⁽⁶⁾ Kadar je treba kakovost olja ali maščob naknadno še preskušati, se delci plovca zamenjajo s steklenimi kroglicami.

5.2 Postopek B

2,5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno (glej točko 8.2), prenese v 400-mililitrsko čašo ali 300-mililitrsko erlenmajerico ter dodajo 100 ml klorovodikove kisline (točka 3.3) in delci plovca. Čaša se pokrije z urnim steklom ali pa se erlenmajerica spoji s povratnim hladilnikom. Pri nizkem plamenu ali na električni kuhalniki plošči se mešanica počasi zavre in se pusti rahlo vreti eno uro. Paziti je treba, da se vzorec ne oprijema sten posode.

Ohladi se in doda toliko filtracijskega sredstva (točka 3.4), da med filtracijo ne pride do izgub olja in maščob. Filtrira se skozi navlažen, dvojni filtrirni papir, ki ne vsebuje maščob. Ostanek se spere s hladno vodo, dokler filtrat ni nevtralen. Prepričati se je treba, da filtrat ne vsebuje nobenih olj ali maščob. Njihova prisotnost pomeni, da se mora vzorec pred hidrolizo ekstrahirati s petroletrom po postopku A.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je ostanek, se prenese na urno steklo in se uro in pol suši v sušilniku (točka 4.3) pri $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dvojni filtrirni papir s suhim ostankom se prenese v kartušo za ekstrakcijo (točka 4.2) in pokrije s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščob. Kartuša se postavi v ekstraktor (točka 4.1), nato pa se nadaljuje, kakor je navedeno v drugem in tretjem odstavku točke 5.1.

5.3 Postopek A in ponovna ekstrakcija s postopkom B

Za določanje vsebnosti surovih olj in maščob v oljnih semenih in oljnatem sadju ter v krmi, v kateri je vsebnost surovih olj/maščob večja od 15 %, bi bilo treba ekstrakcijo opraviti s postopkom A, ponovno ekstrakcijo pa s postopkom B.

To pomeni, da je po ekstrakciji s petroletrom (postopek A), ostanek ali del ostanka ponovno ekstrahirajo s klorovodikovo kislino (postopek B). Vsebnost surovih olj in maščob je vsota rezultata postopkov A in B.

6. Prikaz rezultatov

Masa ostanka se izrazi kot masni delež vzorca.

7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne presega:

- 0,2 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih olj in maščobe, nižje od 5 %,
- 4,0 % relativno glede na najvišji rezultat, za vsebnosti med 5 % do 10 %,
- 0,4 % v absolutni vrednosti za vsebnosti nad 10 %.

8. Opombe

8.1 Pri proizvodih z visoko vsebnostjo olj in maščob, ki jih je težko zdrobiti ali so neprimerni za pripravo homogenega zmanjšane preskusnega vzorca, se uporabi naslednji postopek.

20 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in zmeša z 10 g ali več brezvodnega natrijevega sulfata (točka 3.2). Ekstrahira se s petroletrom (točka 3.1), kakor je navedeno v točki 5.1. Ekstrakt se dopolni s petroletrom do 500 ml (točka 3.1) in premeša. 50 ml raztopine se prenese v majhno suho stehtano bučko, v kateri so delci plovca. Oddestilira se topilo, se osuši, nato pa se nadaljuje, kakor je določeno v zadnjem odstavku točke 5.1.

Iz ostanka po ekstrakciji v kartuši se odstrani topilo, ostanek se zdrobi do velikosti delcev 1 mm, vrne v kartušo za ekstrakcijo (natrijev sulfat se ne doda), nato pa se nadaljuje, kakor je določeno v drugem in tretjem odstavku točke 5.1.

Vsebnost olj in maščob kot masni delež vzorca se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m_1 = masa ostanka po prvi ekstrakciji (aliquot ekstrakta) v gramih

m_2 = masa ostanka po drugi ekstrakciji v gramih

- 8.2 Pri nekaterih proizvodih (npr. z nizko vsebnostjo olj in maščob) se lahko preskusni vzorec poveča.
- 8.3 Hrano za hišne živali, ki vsebuje veliko vode, je treba včasih pred hidrolizo in ekstrakcijo po postopku B zmešati z brezvodnim natrijevim sulfatom.
- 8.4 Pri točki 5.2 je za spiranje ostanka po filtraciji morda učinkoviteje uporabiti vročo vodo namesto hladne.
- 8.5 Pri nekateri krmi je morda treba podaljšati čas sušenja na več kot uro in pol. Odvečnemu sušenju se je treba izogibati, saj lahko povzroči nizke rezultate. Uporabi se lahko tudi mikrovalovna pečica.

H. DOLOČANJE SUROVIH VLAKEN

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje organskih snovi brez maščob v krmi, ki so netopne v kislih in baznih medijih ter so običajno opisane kot surova vlakna.

Metoda se ne uporablja v primeru lesne celuloze in rastlinskega oglja (delci so predrobni).

2. Načelo

Vzorec se po potrebi razmasti in zaporedno obdela s specifičnimi koncentracijami vrelih raztopin žveplove kisline in kalijevega hidroksida. Ostanek se loči s filtracijo skozi filter iz sintranega stekla, spere, posuši, stehta in upepeli pri 475 °C–500 °C. Izguba teže pri upepeljevanju ustreza vsebnosti surovih vlaken v preskusnem vzorcu.

3. Reagenti

- 3.1 Žveplova kislina, $c = 0,13 \text{ mol/l}$
- 3.2 Sredstvo proti penjenju (npr. n-oktanol)
- 3.3 Filtrirno sredstvo (Celite 545 ali enakovredno), segreto na 500 °C za štiri ure (točka 8.6)
- 3.4 Aceton
- 3.5 Petroleter, vrelišče 40 °C–60 °C
- 3.6 Klorovodikova kislina, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7 Raztopina kalijevega hidroksida, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Naprava

- 4.1 Enota za segrevanje za razklop z žveplovo kislino in raztopino kalijevega hidroksida, opremljena z dodatkom za filtrirni lonček (točka 4.2) in odtočno cevjo, ki je preko zamaška priklopljena na tekočino in vakuum, po možnosti s stisnjenim zrakom. Pred vsako uporabo se enota pet minut segreva z vrelo vodo.
- 4.2 Stekljeni filtrirni lonček z nameščeno filtrirno ploščo iz sintranega stekla in velikosti por 40 µm–90 µm. Pred prvo uporabo ga je treba za nekaj minut segreti na 500 °C in ohladiti (točka 8.6).

- 4.3 Valj, volumna vsaj 270 ml, s povratnim hladilnikom, primernim za vretje
- 4.4 Sušilnik s termostatom
- 4.5 Žarilna peč s termostatom
- 4.6 Enota za ekstrakcijo, sestavljena iz podporne plošče za filtrirni lonček (točka 4.2) in odtočne cevi, ki je preko zamaška priklopljena na vakuum in tekočino
- 4.7 Obročki, ki povežejo enoto za segrevanje (točka 4.1), lonček (točka 4.2) in valj (točka 4.3) ter enoto za hladno ekstrakcijo (točka 4.6) in lonček

5. Postopek

1 g pripravljenega vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v lonček (točka 4.2) (glej točke 9.1, 9.2 in 9.3), čemur se doda 1 g filtrirnega sredstva (točka 3.3).

Najprej se povežeta enota za segrevanje (točka 4.1) in filtrirni lonček (točka 4.2), nato pa valj (točka 4.3) in lonček. V povezana valj in lonček se nalije 150 ml vrele žveplove kisline (točka 3.1) in po potrebi nekaj kapljic sredstva proti penjenju (točka 3.2).

Tekočina se zavre v 5 ± 2 minutah ter pusti močno vreti natančno 30 minut.

Odpre se zamašek na odtočni cevi (točka 4.1), žveplove kisline se pod vakuumom filtrira skozi filtrirni lonček, ostanek pa se trikrat zaporedoma spere s po 30 ml vrele vode, pri čemer se zagotovi, da je filtrirni ostanek po vsakem spiranju suh.

Odtočni zamašek se zapre, v povezana valj in lonček se nalije 150 ml vrele raztopine kalijevega hidroksida (točka 3.7), nato pa se doda nekaj kapljic sredstva proti penjenju (točka 3.2). Tekočina se zavre v 5 ± 2 minutah ter pusti močno vreti natančno 30 minut. To se filtrira, postopek spiranja pa se ponovi, kakor je bil uporabljen za žveplove kisline.

Po končnem spiranju in sušenju se lonček z vsebino odklopi in priklopi na enoto za hladno ekstrakcijo (točka 4.6). Ostanek v lončku se pod vakuumom trikrat zaporedoma spere s po 25 ml acetona (točka 3.4), pri čemer se zagotovi, da je filtrirni ostanek po vsakem spiranju suh.

Lonček se suši v sušilniku pri 130 °C do konstantne mase. Po vsakem sušenju se ohladi v eksikatorju in hitro stehta. Lonček se postavi v žarilno peč in pri 475 °C–500 °C žari najmanj 30 minut do konstantne mase (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ne sme presežati 2 mg).

Po vsakem segrevanju in pred merjenjem se lonček najprej ohladi v peči, nato pa še v eksikatorju.

Slepi preskus se izvede brez vzorca. Izguba mase pri upepeljevanju ne sme presežati 4 mg.

6. Izračun rezultatov

Vsebnost surovih vlaken, izražena kot masni delež vzorca, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

m = masa vzorca v gramih

m_0 = izguba mase po upepeljevanju pri določanju v gramih

m_1 = izguba mase po upepeljevanju pri slepem preskusu v gramih

7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presežati:

- 0,6 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih vlaken, manjše od 10 %,
- 6 % relativno glede na višji rezultat za vsebnosti surovih vlaken 10 % ali več.

8. Obnovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, izvedena na istem vzorcu v različnih laboratorijih ne sme presežati:

- 1,0 % v absolutni vrednosti za vsebnosti surovih vlaken, manjše od 10 %,
- 10 % relativno glede na višji rezultat za vsebnosti surovih vlaken 10 % ali več.

9. Opombe

- 9.1 Krmo, ki vsebuje več kakor 10 % surovih maščob, je treba pred analizo razmastiti s petroletrom (točka 3.5). Filtrirni lonček (točka 4.2) z vsebino se poveže z enoto za hladno ekstrakcijo (točka 4.6), ostanek pa se pod vakuumom trikrat zaporedoma spere s po 30 ml petroletra, pri čemer se zagotovi, da je ostanek suh. Lonček z vsebino se poveže z enoto za segrevanje (točka 4.1), nadaljuje pa se v skladu s točko 5.
- 9.2 Krmo, ki vsebuje maščobe, ki se ne morejo neposredno ekstrahirati s petroletrom (točka 3.5), je treba razmastiti, kakor je navedeno v točki 8.1, in ponovno razmastiti po vretju s kislino. Po vretju s kislino in nadaljnjim spiranjem se lonček z vsebino poveže z enoto za hladno ekstrakcijo (točka 4.6) ter trikrat spere s po 30 ml acetona, nato pa trikrat s po 30 ml petroletra. Filtrira se pod vakuumom do suhega stanja, nadaljuje pa se, kakor je navedeno v točki 5, pri čemer se začne z dodajanjem kalijevega hidroksida.
- 9.3 Če krma vsebuje več kot 5 % karbonatov, izraženih kot kalcijev karbonat, se lonček (točka 4.2) z natehtanim vzorcem poveže z enoto za segrevanje (točka 4.1). Vzorec se trikrat spere s po 30 ml klorovodikove kisline (točka 3.6). Po vsakem dodajanju je treba vzorec pustiti stati približno eno minuto, preden se filtrira. Enkrat se spere s 30 ml vode, nato pa se nadaljuje, kakor je navedeno v točki 5.
- 9.4 Če se uporablja naprava v obliki stojala (številni lončki, povezani na isto enoto za segrevanje), se v isti seriji ne smeta opraviti posamezni določanja na istem vzorcu za analizo.
- 9.5 Če je po vretju težko filtrirati kisle in bazične raztopine, se uporabi stisnjen zrak skozi odtočno cev enote za segrevanje in se nato nadaljuje s filtriranjem.
- 9.6 Temperatura upepeljevanja ne presega 500 °C, da se podaljša obstojnost steklenih filtrirnih lončkov. Potrebna je previdnost, da se preprečijo odvečni toplotni šoki med segrevanjem ali hlajenjem.

I. DOLOČANJE SLADKORJA

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje količine reducirajočih sladkorjev in celotnih sladkorjev po inverziji, izraženih kot glukoza ali, kadar je to primerno, saharoza s faktorjem preračunavanja 0,95. Uporablja se za krmne mešanice. Za drugo krmo se uporabljajo posebne metode. Kadar je primerno, se laktoza izmeri ločeno in upošteva pri izračunu rezultata.

Ta metoda se uporablja za določanje vsebnosti sladkorja za uporabo pri izračunu energijske vrednosti krme.

Kadar se vsebnost sladkorja določa za druge namene, se lahko uporabijo druge analizne metode.

2. Načelo

Sladkorji se ekstrahirajo z razredčenim etanolom in raztopina se zbistri z raztopinama Carrez I in II. Po odstranitvi etanola se določijo količine pred inverzijo in po njej po Luff-Schoorlovi metodi.

3. Reagenti

- 3.1 Etanol, 40-odstotna raztopina (v/v), gostota: 0,948 g/ml pri 20 °C, nevtraliziran proti fenolftaleinu

- 3.2 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 3 g led-ocetne kisline se raztopijo v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.3 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se raztopi v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.4 Metil oranž, 0,1-odstotna raztopina (m/v)
- 3.5 Klorovodikova kislina, 4 mol/l
- 3.6 Klorovodikova kislina, 0,1 mol/l
- 3.7 Raztopina natrijevega hidroksida, 0,1 mol/l
- 3.8 Luff-Schoorlov reagent:
Med previdnim mešanjem se v raztopino natrijevega karbonata (točka 3.8.3) vlije raztopina citronske kisline (točka 3.8.2). Doda se raztopina bakrovega sulfata (točka 3.8.1), nato pa se dopolni z vodo do 1 litra. Pusti se čez noč, da se usede, in nato filtrira.
Preveri se koncentracija tako dobljenega reagenta (Cu 0,05 mol/litre; Na_2CO_3 1 mol/litre), glej zadnji odstavek točke 5.4. Vrednost pH raztopine je približno 9,4.
- 3.8.1 Raztopina bakrovega sulfata: v 100 ml vode se raztopi 25 g bakrovega sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ki ne vsebuje železa.
- 3.8.2 Raztopina citronske kisline: v 50 ml vode se raztopi 50 g citronske kisline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).
- 3.8.3 Raztopina natrijevega karbonata: v približno 300 ml tople vode se raztopi 143,8 g brezvodnega natrijevega karbonata. Pusti se, da se ohladi.
- 3.9 Raztopina natrijevega tiosulfata, 0,1 mol/l.
- 3.10 Raztopina škroba: v liter vrele vode se doda suspenzija 5 g topnega škroba v 30 ml vode. Pusti se vreti tri minute, nato se ohladi in po potrebi doda 10 mg živosrebrovega jodida kot konzervansa.
- 3.11 Žveplova kislina, 3 mol/l
- 3.12 Kalijev jodid, 30-odstotna raztopina (m/v)
- 3.13 Zdrobljen plovec, prevret v klorovodikovi kislini, opran z vodo in osušen
- 3.14 3-metilbutan-1-ol
4. **Naprava**
Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.
5. **Postopek**
- 5.1 *Ekstrakcija vzorca*
2,5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v 250-mililitrsko merilno bučko. Doda se 200 ml etanola (točka 3.1) in v mešalniku meša eno uro. Doda se 5 ml raztopine Carrez I (točka 3.2) in meša približno 30 sekund. Doda se 5 ml raztopine Carrez II (točka 3.3) in ponovno meša eno minuto. Dopolni se z etanolom (točka 3.1) do oznake, homogenizira in filtrira. Odstrani se 200 ml filtrata in upari približno do polovice, da se odstrani skoraj ves etanol. Ostanek po uparivanju se s toplo vodo prenese v 200-mililitrsko merilno bučko, ohladi se, dopolni z vodo do oznake, homogenizira in po potrebi filtrira. Ta raztopina se uporabi za določanje količine reducirajočih sladkorjev, po inverziji pa celotnih sladkorjev.
- 5.2 *Določanje reducirajočih sladkorjev*
Odpipetira se največ 25 ml raztopine, ki vsebuje manj kot 60 mg reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza. Po potrebi se dopolni z destilirano vodo do 25 ml in določi vsebnost reducirajočih sladkorjev po Luff-Schoorlovi metodi. Rezultat se izrazi kot masni delež glukoze v vzorcu.

5.3 Določanje celotnih sladkorjev po inverziji

50 ml raztopine se odpipetira v 100-mililitrsko merilno bučko. Doda se nekaj kapljic raztopine metil oranža (točka 3.4), nato pa se previdno in ob neprestanem mešanju doda klorovodikova kislina (točka 3.5), dokler tekočina na postane izrazito rdeča. Doda se 15 ml klorovodikove kisline (točka 3.6), bučka se potopi v skoraj vrelo vodno kopel in v njej pusti 30 minut. Hitro se ohladi na približno 20 °C, nato pa se doda 15 ml raztopine natrijevega hidroksida (točka 3.7). Dopolni se z vodo do 100 ml in homogenizira. Odstrani se največ 25 ml raztopine, ki vsebuje manj kot 60 mg reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza. Po potrebi se dopolni z destilirano vodo do 25 ml in določi vsebnost reducirajočih sladkorjev po Luff-Schoorlovi metodi. Rezultat se izrazi kot masni delež glukoze ali, kadar je to ustrezno, saharoze tako, da se pomnoži s faktorjem 0,95.

5.4 Titracija po Luff-Schoorlovi metodi

25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (točka 3.8) se odpipetira v 300-mililitrsko erlenmajerico; doda se natančno 25 ml zbistrene raztopine sladkorja. Dodata se 2 zrnji plovca (točka 3.13) in med ročnim mešanjem se segreva nad prostim plamenom srednje višine tako, da raztopina zavre v približno dveh minutah. Erlenmajerica se takoj postavi na žično mrežico, prevlečeno z azbestom, ki ima odprtino s premerom približno 6 cm, pod katero je prižgan plamen. Plamen se naravna tako, da se segreva le dno erlenmajerice. Na erlenmajerico se namesti povratni hladilnik. Pustimo vreti natanko deset minut. Takoj se ohladi v mrzli vodi in čez približno pet minut titrira na naslednji način:

doda se 10 ml raztopine kalijevega jodida (točka 3.12) in takoj nato (previdno zaradi možnosti močnega penjenja) 25 ml žveplove kisline (točka 3.11). Z raztopino natrijevega tiosulfata (točka 3.9) se titrira do svetlorumene barve, doda se indikator škrob (točka 3.10), nato pa se titracija zaključí.

Enaka titracija se izvede brez vretja z natančno izmerjeno mešanico 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (točka 3.8) in 25 ml vode, potem ko se ji doda 10 ml raztopine kalijevega jodida (točka 3.12) in 25 ml žveplove kisline (točka 3.11).

6. Izračun rezultatov

S pomočjo tabele se določi količina glukoze v mg, ki ustreza razliki med vrednostma obeh titracij, izraženi v ml natrijevega tiosulfata 0,1 mol/l. Rezultat se izrazi kot masni delež vzorca.

7. Posebni postopki

- 7.1 Pri krmi, ki vsebuje veliko melase, in drugi krmi, ki ni zelo homogena, se natehta 20 g vzorca in s 500 ml vode prenese v litrsko merilno bučko. V mešalniku se meša eno uro. Raztopina se zbistri z uporabo raztopin Carrez I (točka 3.2) in II (točka 3.3), kakor je opisano v točki 5.1, vendar se uporabi štirikratna količina vsakega reagenta. Bučka se dopolni z 80-odstotnim etanolom (v/v) do oznake.

Homogenizira se in filtrira. Etanol se odstrani, kakor je opisano v točki 5.1. Če ni dekstriniranega škroba, se dopolni do oznake z destilirano vodo.

- 7.2 V primeru melas in posamične krme, ki vsebujejo veliko sladkorja in so skoraj brez škroba (rožiči, posušene rezine pese itd.), se natehta 5 g in prenese v 250-mililitrsko merilno bučko, doda se 200 ml destilirane vode in eno uro ali po potrebi več meša v mešalniku. Raztopina se zbistri z uporabo raztopin Carrez I (točka 3.2) in II (točka 3.3), kakor je opisano v točki 5.1. Dopolni se z mrzlo vodo do oznake, homogenizira in filtrira. Za določanje količine celotnih sladkorjev se nadaljuje, kakor je opisano v točki 5.3.

8. Opombe

- 8.1 Za preprečevanje penjenja je priporočljivo, da se pred vretjem z Luff-Schoorlovim reagentom doda (ne glede na volumen) približno 1 ml 3-metilbutan-1-ola (točka 3.14).
- 8.2 Razlika med vsebnostjo celotnih sladkorjev po inverziji, izraženih kot glukoza, in vsebnostjo reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza, pomnoženo z 0,95, je masni delež saharoze.
- 8.3 Za določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev, razen laktoze, se lahko uporabljata dve metodi:

8.3.1 Za približen izračun se vsebnost laktoze, določena z drugo analizno metodo, pomnoži z 0,675, dobljeni rezultat pa se odšteje od vsebnosti reducirajočih sladkorjev.

8.3.2 Za natančen izračun reducirajočih sladkorjev, razen laktoze, je treba za dve končni določitvi uporabiti isti vzorec. Ena od analiz se izvede na delu raztopine, ki nastane pri postopku iz točke 5.1, druga pa na delu raztopine, ki nastane pri določanju laktoze z metodo, določeno za navedeni namen (po fermentiranju drugih vrst sladkorja in zbistritve).

V obeh primerih se količina sladkorja določi z Luff-Schoorlovo metodo in izračuna v mg glukoze. Ena vrednost se odšteje od druge in razlika se izrazi kot masni delež vzorca.

Primer

Za vsako določanje oba uporabljena volumna ustrezata 250 mg vzorca.

V prvem primeru porabimo 17 ml raztopine natrijevega tiosulfata 0,1 mol/l, kar ustreza 44,2 mg glukoze; v drugem pa 11 ml, kar ustreza 27,6 mg glukoze.

Razlika je 16,6 mg glukoze.

Vsebnost reducirajočih sladkorjev (razen laktoze), izračunana kot glukoza, je zato:

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

Tabela vrednosti za 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, dve minuti segrevanja, deset minut vretja

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

J. DOLOČANJE LAKTOZE

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni laktoze v krmi, ki vsebuje več kot 0,5 % laktoze.

2. Načelo

Sladkorji se raztopijo v vodi. Raztopina se fermentira s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*, ki ne spreminjajo laktoze. Po zbistritvi in filtriranju se vsebnost laktoze v filtratu določi po Luff-Schoorlovi metodi.

3. Reagenti

3.1 Suspenzija kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g svežih kvasovk se raztopi v 100 ml vode. Suspenzija je ob hranjenju v hladilniku uporabna največ en teden.

3.2 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 3 g led-ocetne kisline se raztopijo v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.

3.3 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se raztopi v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.

3.4 Luff-Schoorlov reagent:

Med previdnim mešanjem se v raztopino natrijevega karbonata (točka 3.4.3) vlije raztopina citronske kisline (točka 3.4.2). Doda se raztopina bakrovega sulfata (točka 3.4.1), nato pa se dopolni z vodo do 1 litra. Pusti se čez noč, da se usede, in nato filtrira. Preveri se koncentracija tako dobljenega reagenta (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). Vrednost pH raztopine je približno 9,4.

3.4.1 Raztopina bakrovega sulfata: v 100 ml vode se raztopi 25 g bakrovega sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ki ne vsebuje železa.

3.4.2 Raztopina citronske kisline: v 50 ml vode se raztopi 50 g citronske kisline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

3.4.3 Raztopina natrijevega karbonata: v približno 300 ml tople vode se raztopi 143,8 g brezvodnega natrijevega karbonata. Pusti se, da se ohladi.

3.5 Zdrobljen plovec, prevret v klorovodikovi kislini, opran z vodo in osušen

3.6 Kalijev jodid, 30-odstotna raztopina (m/v)

3.7 Žveplove kisline, 3 mol/l

3.8 Raztopina natrijevega tiosulfata, 0,1 mol/l

3.9 Škrobovica: v 1 liter vrele vode se doda suspenzija 5 g topnega škroba v 30 ml vode. Pusti se vreti tri minute, nato se ohladi in po potrebi doda 10 mg živosrebrovega jodida kot konzervansa.

4. Naprava

Vodna kopel s termostatom, nastavljenim na 38 °C–40 °C

5. Postopek

1 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Doda se 25 ml–30 ml vode. Bučko za trideset minut postavimo v vrelo vodno kopel, nato ohladimo na približno 35 °C. Doda se 5 ml suspenzije kvasovk (točka 3.1) in homogenizira. Bučka se pusti dve uri v vodni kopeli pri temperaturi 38 °C–40 °C. Ohladi se na približno 20 °C.

Doda se 2,5 ml raztopine Carrez I (točka 3.2) in meša trideset sekund, nato se doda 2,5 ml raztopine Carrez II (točka 3.3) in ponovno meša trideset sekund. Dopolni se z vodo do 100 ml, premeša in filtrira. Del filtrata, ki ne presega 25 ml in ki priporočljivo vsebuje 40 mg do 80 mg laktoze, se odpipetira in prenese v 300-mililitrsko erlenmajerico. Po potrebi se dopolni z vodo do 25 ml.

Slepi preskus s 5 ml suspenzije kvasovk (točka 3.1) se izvede pri enakih pogojih. Vsebnost laktoze se določi po Luff-Schoorlovi metodi na naslednji način: doda se natančno 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (točka 3.4) in dve zrnji plovca (točka 3.5). Med ročnim mešanjem se segreva nad prostim plamenom srednje jakosti tako, da tekočina zavre v približno dveh minutah. Erlenmajerica se takoj postavi na žično mrežico, prevlečeno

z azbestom, ki ima odprtino s premerom približno 6 cm, pod katero je prižgan plamen. Plamen se naravna tako, da se segreva le dno erlenmajerice. Na erlenmajerico se namesti povratni hladilnik. Pustimo vreti natanko deset minut. Takoj se ohladi v mrzli vodi in čez približno pet minut titrira na naslednji način:

doda se 10 ml raztopine kalijevega jodida (točka 3.6) in takoj nato (previdno zaradi možnosti močnega penjenja) 25 ml žveplove kisline (točka 3.7). Z raztopino natrijevega tiosulfata (točka 3.8) se titrira do svetlorumene barve, doda se indikator škrob (točka 3.9), nato pa se titracija zaključí.

Enaka titracija se izvede brez vretja z natančno izmerjeno mešanico 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (točka 3.4) in 25 ml vode, potem ko se ji doda 10 ml raztopine kalijevega jodida (točka 3.6) in 25 ml žveplove kisline (točka 3.7).

6. Izračun rezultatov

S pomočjo priložene tabele se določi količina laktoze v mg, ki ustreza razliki med rezultatoma dveh titracij, izraženima v ml natrijevega tiosulfata 0,1 mol/l.

Rezultat se izrazi kot masni delež brezvodne laktoze v vzorcu.

7. Opomba

1. Pri proizvodih, ki vsebujejo več kot 40 % fermentiranega sladkorja, se uporabi več kot 5 ml suspenzije kvasovk (točka 3.1).
2. V krmi z zmanjšano vsebnostjo laktoze (npr. mačje mleko) se laktoza pretvori v fruktozo, ki ni popolnoma fermentirana v dveh urah, kar privede do višjih ali lažno pozitivnih rezultatov (ker ostanki fruktoze ostanejo v ekstraktu).

Tabela vrednosti za 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, dve minuti segrevanja, deset minut vretja

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

K. DOLOČANJE ŠKROBA

POLARIMETRIČNA METODA

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje ravni škroba in visokomolekularnih produktov razgradnje škroba v krmi za preverjanje skladnosti z označeno energijsko vrednostjo (določbe iz Priloge VII) in Uredbo (ES) št. 767/2009.

Ta metoda se uporablja za določanje vsebnosti škroba za uporabo pri izračunu energijske vrednosti krme.

Kadar se vsebnost škroba določa za druge namene, se lahko uporabijo druge analizne metode.

2. **Načelo**

Metoda vključuje dve določanji. Pri prvi se vzorec obdela z razredčeno klorovodikovo kislino. Po zbistritvi in filtriranju se s polarimetrijo izmeri optična rotacija raztopine.

Pri drugi se vzorec ekstrahira s 40-odstotnim etanolom. Po zakisljevanju filtrata s klorovodikovo kislino ter zbistritvi in filtriranju se izmeri optična rotacija tako kot pri prvem določanju.

Razlika med dvema meritvama, pomnožena z znanim faktorjem, je vsebnost škroba v vzorcu.

3. **Reagenti**

3.1 Klorovodikova kislina, 25-odstotna raztopina (m/v), gostota: 1,126 g/ml

3.2 Klorovodikova kislina, 1,13-odstotna raztopina (m/v)

Koncentracija se mora preveriti s titracijo z 0,1 mol/l raztopino natrijevega hidroksida v prisotnosti 0,1-odstotnega (m/v) metil rdečega v 94-odstotnem (v/v) etanolu. Za nevtralizacijo 10 ml je potrebno 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 3 g led-ocetne kisline se raztopijo v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.

3.4 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se raztopi v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.

3.5 Etanol, 40-odstotna raztopina (v/v), gostota: 0,948 g/ml pri 20 °C.

4. **Naprava**

4.1 250 ml erlenmajerica s standardnim brušenim vratom in povratnim hladilnikom

4.2 Polarimeter ali saharimeter

5. **Postopek**

5.1 *Priprava vzorca*

Vzorec se zdrobi tako, da vsi delci preidejo skozi sito z okroglimi luknjicami premera 0,5 mm.

5.2 Določanje celotne optične rotacije (P ali S) (glej točko 7.1)

2,5 g zdrobljenega vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Doda se 25 ml klorovodikove kisline (točka 3.2), pretrese se, da nastane enakomerna porazdelitev preskusnega vzorca, nato pa se doda nadaljnjih 25 ml klorovodikove kisline (točka 3.2). Bučka se potopi v vrelo vodno kopel in prve tri minute močno in enakomerno stresa, da se prepreči nastanek aglomeratov. V vodni kopeli mora biti toliko vode, da kopel ostane na točki vrelišča, ko se vanjo potopi bučka. Bučka se med stresanjem ne sme odstraniti iz kopeli. Po točno 15 minutah se odstrani iz kopeli, doda se 30 ml hladne vode in takoj ohladi na 20 °C.

Doda se 5 ml raztopine Carrez I (točka 3.3) in stresa približno 30 sekund. Nato se doda 5 ml raztopine Carrez II (točka 3.4) in ponovno stresa 30 sekund. Dopolni se z vodo do oznake, premeša in filtrira. Če filtrat ni popolnoma bister (kar je redko), se ponovi določanje z uporabo večje količine raztopin Carrez I in II, na primer 10 ml.

Optična rotacija raztopine v 200-milimetrski epruveti se izmeri s polarimetrom ali saharimetrom.

5.3 Določanje optične rotacije (P' ali S') snovi, ki so topne v 40-odstotnem etanolu

5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno, prenese v 100-mililitrsko merilno bučko in doda se približno 80 ml etanola (točka 3.5) (glej točko 7.2). Bučka se pusti stati 1 uro na sobni temperaturi; v tem času se šestkrat močno pretrese, da se preskusni vzorec temeljito premeša z etanolom. Dopolni se z etanolom (točka 3.5) do oznake, premeša in filtrira.

50 ml filtrata (kar ustreza 2,5 g vzorca) se odpipetira v 250-mililitrsko erlenmajerico, doda se 2,1 ml klorovodikove kisline (točka 3.1) in močno pretrese. Erlenmajerico spojimo s povratnim hladilnikom in jo potopimo v vrelo vodno kopel. Po točno 15 minutah odstranimo erlenmajerico iz kopeli, prenesemo vsebino v 100 ml merilno bučko, speremo z malo hladne vode in ohladimo na 20 °C.

Zbistrimo z uporabo raztopin Carrez I (točka 3.3.) in II (točka 3.4), dopolnimo do oznake z vodo, premešamo, filtriramo in izmerimo optično rotacijo, kot je navedeno v točki 5.2, drugi in tretji odstavek.

6. Izračun rezultatov

Vsebnost škroba (%) se izračuna na naslednji način:

6.1 Meritve s polarimetrom

$$\text{Vsebnost škroba (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = celotna optična rotacija v kotnih stopinjah

P' = optična rotacija snovi, ki so topne v 40-odstotnem (V/V) etanolu, v kotnih stopinjah

$[\alpha]_D^{20^\circ}$ = specifična optična rotacija čistega škroba Numerične vrednosti, ki se običajno uporabljajo za ta faktor, so naslednje:

- + 185,9: rižev škrob
- + 185,7: krompirjev škrob
- + 184,6: koruzni škrob
- + 182,7: pšenični škrob
- + 181,5: ječmenov škrob
- + 181,3: ovseni škrob
- + 184,0: druge vrste škroba in škrobnih mešanic v krmnih mešanicah

6.2 Meritve s saharimetrom

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

S = celotna optična rotacija v stopinjah saharimetra

S' = optična rotacija snovi, ki so topne v 40-odstotnem (v/v) etanolu, v stopinjah saharimetra

N = masa (g) saharoze v 100 ml vode, pri kateri je optična rotacija 100 saharimetrovskih stopinj, kadar se meri z uporabo 200-milimetrovске epruvete

16,29 g za francoske saharimetre

26,00 g za nemške saharimetre

20,00 g za mešane saharimetre

$[\alpha]_D^{20}$ = specifična optična rotacija čistega škroba (glej točko 6.1)

6.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,4 v absolutni vrednosti za vsebnost škroba, ki je nižja od 40 %, in 1 % relativno za vsebnost škroba, ki je enaka ali višja od 40 %.

7. Opombe

7.1 Če vzorec vsebuje več kot 6 % karbonatov, izračunanih v obliki kalcijevega karbonata, se jih mora pred določenjem celotne optične rotacije razkrojiti z obdelavo z natančno ustrezno količino razredčene žveplove kisline.

7.2 V primeru proizvodov, ki imajo visoko vsebnost laktoze, kot je serum mleka v prahu ali posneto mleko v prahu, se po dodatku 80 ml etanola (točka 3.5) izvaja naslednje. Na bučko namestimo povratni hladilnik in jo za 30 minut potopimo v vodno kopel pri 50 °C. Pusti se, da se ohladi, in nadaljuje z analizo, kakor je navedeno v točki 5.3.

7.3 Naslednja posamična krmila, kadar so prisotna v znatni količini v krmi, povzročajo motnje pri določenju vsebnosti škroba s polarimetrično metodo, zaradi česar so lahko rezultati nepravilni:

- proizvodi iz (sladkorne) pese, kot so pulpa (sladkorne) pese, melasa (sladkorne) pese, melasirana pulpa (sladkorne) pese, vinas (sladkorne) pese, (pesni) sladkor,
- pulpa citrusov,
- laneno seme; pogača iz lanenih semen; ekstrahirano laneno seme,
- seme oljne ogrščice; pogača iz semen oljne ogrščice; ekstrahirano seme oljne ogrščice; luščine oljne ogrščice,
- sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme; sončnično seme, delno oluščeno, ekstrahirano,
- pogača iz kopre; ekstrahirana kopra,
- krompirjeva pulpa,
- suhe kvasovke,
- proizvodi z visoko vsebnostjo inulina (npr. čips in moka iz topinamburja),
- ocvirki,
- sojini proizvodi.

V teh primerih se lahko uporabi analizna metoda, določena z Uredbo Komisije (ES) št. 121/2008 ⁽⁷⁾. Ta metoda se lahko uporabi tudi za krmo, ki vsebuje manj kot 1 % škroba.

(7) Uredba Komisije (ES) št. 121/2008 z dne 11. februarja 2008 o določitvi analitske metode za določanje vsebnosti škroba v izdelkih, ki se uporabljajo kot krma za živali (oznaka KN 2309) (UL L 37, 12.2.2008, str. 3).

L. DOLOČANJE SUROVEGA PEPELA

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje vsebnosti surovega pepela v krmi.

2. **Načelo**

Vzorec se upepeli pri 550 °C; ostanek se stehta.

3. **Reagenti**

Amonijev nitrat, 20-odstotna raztopina (m/v)

4. **Naprava**

4.1 Električna kuhalna plošča

4.2 Električna žarilna peč s termostatom

4.3 Žarilni lončki za upepeljevanje iz kremenca, porcelana ali platine, pravokotni (približno 60 mm × 40 mm × 25 mm) ali okrogli (premer: 60 mm do 75 mm, višina: 20 mm do 40 mm)

5. **Postopek**

Približno 5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno (2,5 g pri proizvodih, ki lahko nabreknejo) in prenese v žarilni lonček za upepelitev, ki se predhodno segreje na 550 °C, ohladi in tarira. Lonček se postavi na električno kuhalno ploščo in postopoma segreva, da snov zogljeni. Upepeli se v skladu s točko 5.1 ali 5.2.

5.1 Lonček se postavi v umerjeno žarilno peč, segreto na 550 °C. Pri tej temperaturi se pusti, dokler ne nastane bel, svetlosiv ali rdečkast pepel, ki je videti, da ne vsebuje ogljikovih delcev. Lonček se postavi v eksikator, pusti se, da se ohladi, in takoj stehta.

5.2 Lonček se postavi v umerjeno žarilno peč, segreto na 550 °C. Upepeljuje se 3 ure. Lonček se postavi v eksikator, pusti se, da se ohladi, in takoj stehta. Ponovno se upepeljuje za 30 minut, pri čemer mora biti masa pepela konstantna (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ne sme presegati 1 mg).

6. **Izračun rezultatov**

Masa ostanka se izračuna tako, da se odšteje tara.

Rezultat se izrazi kot odstotni delež vzorca.

7. **Opombe**

7.1 *Snovi, ki se težko upepelijo*, je treba najprej najmanj tri ure upepeljevati, nato ohladiti in jim dodati nekaj kapljic 20-odstotne raztopine amonijevega nitrata ali vode (pazljivo, da se pepel ne razprši ali da ne nastanejo grudice). Po sušenju v sušilniku se nadaljuje s kalciniranjem. Postopek se po potrebi ponovi, dokler upepelitev ni popolna.

7.2 *Pri snoveh, ki so odporne na obdelavo iz točke 7.1*, se nadaljuje na naslednji način: po triurni upepelitvi se pepel prenese v toplo vodo in filtrira skozi majhen filter brez pepela. Filter in njegova vsebina se upepelita v istem lončku. Filtrat se prenese v ohlajen lonček, upari do suhega, upepeli in stehta.

7.3 *Pri oljih in maščobah* se 25 g vzorca natančno natehta v lonček ustrezne velikosti. Zogljeni se tako, da se snov zažge s trakom iz filtrirnega papirja brez pepela. Po sežigu se navlaži s čim manj vode. Osuši in upepeli se, kakor je opisano v točki 5.

M. DOLOČANJE PEPELA, NETOPNEGA V KLOROVODIKOVI KISLINI

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje ravni mineralnih snovi v krmi, netopnih v klorovodikovi kislini. Glede na naravo vzorca se lahko uporabljata dve metodi.

- 1.1 *Metoda A*: uporablja se za organska posamična krmila in za večino krmnih mešanic;
- 1.2 *Metoda B*: uporablja se za mineralne spojine in mešanice ter krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 1 % snovi, netopnih v klorovodikovi kislini in določenih po metodi A.

2. Načelo

- 2.1 *Metoda A*: vzorec se upepeli, pepel se prevre v klorovodikovi kislini, netopni ostanek pa filtrira in stehta.
- 2.2 *Metoda B*: vzorec se obdela s klorovodikovo kislino. Raztopina se filtrira, ostanek se upepeli, tako dobljeni pepel pa se obdela v skladu z metodo A.

3. Reagenti

- 3.1 Klorovodikova kislina, 3 mol/l
- 3.2 Trikloroocetna kislina, 20-odstotna raztopina (m/v)
- 3.3 Trikloroocetna kislina, 1-odstotna raztopina (m/v)

4. Naprava

- 4.1 Električna kuhalna plošča
- 4.2 Električna žarilna peč s termostatom
- 4.3 Žarilni lončki za upepeljevanje iz kremenca, porcelana ali platine, pravokotni (približno 60 × 40 × 25 mm) ali okrogli (premer: 60 do 75 mm, višina: 20 do 40 mm)
- 4.4 Filtri brez pepela

5. Postopek

5.1 *Metoda A*

Vzorec se upepeli po metodi za določanje surovega pepela. Lahko se uporabi pepel, dobljen pri navedeni analizi.

Pepel se prenese v 250- do 400-mililitrsko čašo s 75 ml klorovodikove kisline (točka 3.1). Počasi segrejemo do vrenja in pustimo rahlo vreti petnajst minut. Topla raztopina se filtrira skozi filtrirni papir brez pepela, ostanek pa se spira s toplo vodo, dokler kislina ne preneha. Filter z ostankom in pepelom se posuši v tariranem žarilnem lončku pri najmanj 550 °C in največ 700 °C. Ohladi se v eksikatorju in stehta.

5.2 *Metoda B*

5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in prenese v 250- do 400-mililitrsko čašo. Doda se 25 ml vode in nato 25 ml klorovodikove kisline (točka 3.1), premeša se, nato pa se počaka, da se preneha peniti. Doda se še 50 ml klorovodikove kisline (točka 3.1). Počaka se, da se preneha izločati plin, nato pa se čaša postavi v vrelo vodno kopel za trideset minut ali po potrebi dlje, da se popolnoma hidrolizira kakršen koli škrob, ki je lahko prisoten. Vsebina, ki je še topla, se filtrira skozi filter brez pepela, filter pa se spere s 50 ml tople vode (glej točko 7). Filter, ki vsebuje ostanek, se prenese v žarilni lonček, posuši in upepeli pri najmanj 550 °C in največ 700 °C. Pepel se prenese v 250- do 400-mililitrsko čašo s 75 ml klorovodikove kisline (točka 3.1); nadaljuje se, kakor je opisano v drugem pododstavku točke 5.1.

6. Izračun rezultatov

Masa ostanka se izračuna tako, da se odšteje tara. Rezultat se izrazi kot odstotni delež vzorca.

7. Opomba

Če pri filtriranju nastopijo težave, se analiza ponovi, pri čemer se 50 ml klorovodikove kisline (točka 3.1) nadomesti s 50 ml 20-odstotne trikloroocetne kisline (m/v) (točka 3.2), filter pa se spere s toplo raztopino 1-odstotne trikloroocetne kisline (točka 3.3).

N. DOLOČANJE CELOTNEGA FOSFORJA

Celotni fosfor se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 15510 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, železa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena in svinca z ICP-AES, ali
- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 15621 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, žvepla, železa, cinka, bakra, mangana in kobalta po razklopu pod tlakom z ICP-AES, ali
- fotometrično metodo, kot je opisana v nadaljevanju.

FOTOMETRIČNA METODA

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje celotne vsebnosti fosforja v krmi. Zlasti primerna je za analizo proizvodov z nizko vsebnostjo fosforja. V nekaterih primerih (pri proizvodih, ki vsebujejo veliko fosforja) se lahko uporabi gravimetrična metoda.

2. Načelo

Vzorec se mineralizira s suhim sežigom (pri organski krmi) ali z razklopom s kislino (pri mineralnih spojinah in tekoči krmi) ter prenese v kislo raztopino. Raztopini se doda molibdovanadatni reagent. Optična gostota rumene raztopine, ki pri tem nastane, se meri s spektrofotometrom pri 430 nm.

3. Reagenti

- 3.1 Kalcijev karbonat.
- 3.2 Klorovodikova kislina, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (približno 6 mol/l).
- 3.3 Dušikova kislina, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.
- 3.4 Dušikova kislina, $\rho_{20} = 1,38$ g/ml do 1,42 g/ml.
- 3.5 Žveplove kislina, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.6 Molibdovanadatni reagent: v litrski merilni bučki se zmeša 200 ml raztopine amonijevega heptamolibdata (točka 3.6.1), 200 ml raztopine amonijevega monovanadata (točka 3.6.2) in 134 ml dušikove kisline (točka 3.4). Dopolni se z vodo do oznake.
- 3.6.1 Raztopina amonijevega heptamolibdata: v vroči vodi se raztopi 100 g amonijevega heptamolibdata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Doda se 10 ml amonijaka (gostota 0,91 g/ml) in dopolni z vodo do 1 litra.
- 3.6.2 Raztopina amonijevega monovanadata: v 400 ml vroče vode se raztopi 2,35 g amonijevega monovanadata (NH_4VO_3). Med neprestanim mešanjem se počasi doda 20 ml razredčene dušikove kisline (7 ml HNO_3 (točka 3.4) + 13 ml H_2O) in dopolni z vodo do 1 litra.
- 3.7 Standardna raztopina 1 mg fosforja na ml: v vodi se raztopi 4,387 g kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4). Dopolni se z vodo do 1 litra.

4. **Naprava**

- 4.1 Žarilni lončki iz kremenca, porcelana ali platine.
- 4.2 Električna žarilna peč s termostatom, nastavljenim na 550 °C.
- 4.3 250-mililitrska Kjeldahlova bučka.
- 4.4 Merilne bučke in precizijske pipete.
- 4.5 Spektrofotometer.
- 4.6 Epruvete s premerom približno 16 mm, z brušenimi zamaški 14,5 mm; volumen: 25 ml do 30 ml.

5. **Postopek**

5.1 *Priprava raztopine*

Glede na naravo vzorca se raztopina pripravi, kakor je navedeno v točki 5.1.1 ali 5.1.2.

5.1.1 Standardni postopek

1 g vzorca ali več se natehta na 1 mg natančno. Preskusni vzorec se prenese v Kjeldahlovo bučko, doda se 20 ml žveplove kisline (točka 3.5), pretrese se, da se vzorec popolnoma prepoji s kislino in da se ne sprijema sten bučke, nato se segreje in pusti vreti 10 minut. Pusti se, da se nekoliko ohladi, dodata se 2 ml dušikove kisline (točka 3.4), zmerno se segreje, pusti se, da se nekoliko ohladi, doda se še nekaj dušikove kisline (točka 3.4) in ponovno segreje do vretja. Postopek se ponavlja do nastanka brezbarvne raztopine. Ohladi se, doda nekaj vode, tekočina se prelije v 500-mililitrsko merilno bučko, Kjeldahlova bučka pa se spere z vročo vodo. Pusti se, da se ohladi, dopolni se z vodo do oznake, homogenizira in filtrira.

5.1.2 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi in ne vsebujejo kalcijevih in magnezijevih dihidrogen fosfatov

V žarilni lonček se natehta približno 2,5 g vzorca na 1 mg natančno. Doda se 1 g kalcijevega karbonata (točka 3.1) in meša, da se snovi popolnoma premešata. Upepeljuje se v pečici pri 550 °C, da nastane bel ali siv pepel (majhna količina oglja ni problematična). Pepel se prenese v 250-mililitrsko čašo. Doda se 20 ml vode, nato pa se dodaja klorovodikova kislina (točka 3.2), dokler se ne preneha peniti. Doda se še 10 ml klorovodikove kisline (točka 3.2). Čaša se postavi na peščeno kopel in pusti uparjavati do suhega, da kremen postane netopen. Ostanek se raztopi v 10 ml dušikove kisline (točka 3.3) in se na peščeni kopeli ali električni kuhalni plošči pusti vreti 5 minut, raztopina pa ne sme upariti v celoti. Tekočina se prelije v 500-mililitrsko merilno bučko, čaša pa se večkrat spere z vročo vodo. Pusti se, da se ohladi, dopolni se z vodo do oznake, homogenizira in filtrira.

5.2 *Nastanek barve in merjenje optične gostote*

Alikvot filtrata iz točke 5.1.1 ali 5.1.2 razredčimo tako, da dobimo koncentracijo fosforja do 40 µg/ml. 10 ml te raztopine se prenese v epruveto (točka 4.6) in doda 10 ml molibdovanadatnega reagenta (točka 3.6). Homogenizira se in pusti stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmeri se optična gostota s spektrofotometrom pri 430 nm raztopine, ki se dobi z dodajanjem 10 ml molibdovanadatnega reagenta (točka 3.6) v 10 ml vode.

5.3 *Umeritvena krivulja*

Iz standardne raztopine (točka 3.7) se pripravijo raztopine, ki vsebujejo 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg oz. 40 µg fosforja na ml. V 10 ml vsake izmed teh raztopin se doda 10 ml molibdovanadatnega reagenta (točka 3.6). Homogenizira se in pusti stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmeri se optična gostota, kakor je navedeno v točki 5.2. Umeritvena krivulja se pripravi tako, da se v diagram vnesejo izmerjene optične gostote ustreznih količin fosforja. Za koncentracije med 0 µg/ml in 40 µg/ml bo krivulja linearna.

6. **Izračun rezultatov**

Količina fosforja v preskusnem vzorcu se določi iz umeritvene krivulje.

Rezultat se izrazi kot odstotni delež vzorca.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne presega:

- 3 % relativno glede na višji rezultat, če je vsebnost fosforja nižja od 5 %,
- 0,15 % v absolutni vrednosti, če je vsebnost fosforja 5 % ali več.

O. DOLOČANJE KLORA IZ KLORIDOV

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanja količine klora v kloridih, topnih v vodi, ki so običajno izraženi kot natrijev klorid. Uporablja se za vso krmo.

2. Načelo

Kloridi se raztopijo v vodi. Če proizvod vsebuje organske snovi, se zbistri. Raztopina se rahlo nakisa z dušikovo kislino in kloridi se oborijo v obliki srebrovega klorida z raztopino srebrovega nitrata. Presežek srebrovega nitrata se titrira z raztopino amonijevega tiocianata po Volhardovi metodi.

3. Reagenti

- 3.1 Raztopina amonijevega tiocianata, 0,1 mol/l.
- 3.2 Raztopina srebrovega nitrata, 0,1 mol/l.
- 3.3 Nasičena raztopina amonij-železovega sulfata $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4 Dušikova kislina, gostota: 1,38 g/ml.
- 3.5 Dietileter.
- 3.6 Aceton.
- 3.7 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 3 g led-ocetne kisline se raztopijo v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.8 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se raztopi v vodi. Dopolni se z vodo do 100 ml.
- 3.9 Aktivno oglje, ki ne vsebuje kloridov in jih ne absorbira.

4. Naprava

Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.

5. Postopek

5.1 Priprava raztopine

Glede na naravo vzorca se raztopina pripravi, kakor je navedeno v točki 5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3.

Hkrati se opravi *šlepi preskus* brez vzorca, ki se analizira.

5.1.1 Vzorci brez organskih snovi

Največ 10 g vzorca, ki vsebuje največ 3 g klora v obliki kloridov, se natehta na 1 mg natančno. S 400 ml vode se prenese v 500-mililitrsko merilno bučko pri približno 20 °C. Trideset minut se meša v mešalcu, dopolni do oznake, premeša in filtrira.

5.1.2 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi, razen proizvodov iz točke 5.1.3

Približno 5 g vzorca se natehta na 1 mg natančno in se skupaj z 1 g aktivnega oglja prenese v 500-mililitrsko merilno bučko. Doda se 400 ml vode s temperaturo približno 20 °C in 5 ml raztopine Carrez I (točka 3.7), meša se 30 sekund in nato doda 5 ml raztopine Carrez II (točka 3.8). Trideset minut se meša v mešalcu, dopolni do oznake, premeša in filtrira.

5.1.3 Kuhana krma, lanove pogače in moka, proizvodi, ki vsebujejo veliko lanene moke, in drugi proizvodi, ki vsebujejo veliko lepila ali koloidnih snovi (na primer dekstriniran škrob)

Raztopina se pripravi, kakor je opisano v točki 5.1.2, vendar se ne filtrira. Dekantira se (po potrebi centrifugira), 100 ml tekočega supernatanta pa se odstrani in prenese v 200-mililitrsko merilno bučko. Zmeša se z acetonom (točka 3.6) in z njim dopolni do oznake, homogenizira in filtrira.

5.2 Titracija

S pipeto se v erlenmajerico prenese 25 ml–100 ml filtrata (glede na pričakovano vsebnost klora), ki nastane pri postopku iz točke 5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3. Alikvot ne sme vsebovati več kot 150 mg klora (Cl). Po potrebi z vodo razredčimo na najmanj 50 ml, dodamo 5 ml dušikove kisline (točka 3.4), 2 ml nasičene raztopine amonij-železovega (III) sulfata (točka 3.3) in dve kapljici raztopine amonijevega tiocianata (točka 3.1), ki ga dodamo iz birete, napolnjene do oznake nič. Z bireto se doda raztopina srebrovega nitrata (točka 3.2), tako da nastane 5 ml presežka. Doda se 5 ml dietiletra (točka 3.5) in dobro se pretrese, da oborina koagulira. Presežek srebrovega nitrata se titrira z raztopino amonijevega tiocianata (točka 3.1), dokler ne nastane rdečkastorjavi odtenek, ki je obstojen eno minuto.

6. Izračun rezultatov

Količina klora (X), izražena kot odstotni delež natrijevega klorida, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

V_1 = ml dodane raztopine srebrovega nitrata 0,1 mol/l

V_2 = ml za titracijo uporabljene raztopine amonijevega tiocianata 0,1 mol/l

m = g mase vzorca v alikvotu.

Če je pri slepem preskusu uporabljen srebrov nitrat 0,1 mol/l, se ta vrednost odšteje od volumna ($V_1 - V_2$).

7. Opombe

7.1 Titracija se lahko izvede tudi s potenciometrijo ali amperometrijo.

7.2 Proizvodi, ki vsebujejo veliko olj in maščob, se najprej razmastijo z dietiletrom ali petroletrom.

7.3 Pri ribji moki se titracija lahko izvede z Mohrovo metodo.“

PRILOGA IV

„PRILOGA IV

ANALIZNE METODE ZA NADZOR RAVNI DOVOLJENIH DODATKOV V KRMI

A. DOLOČANJE VITAMINA A

Vitamin A se določi z naslednjim:

- analizo metodo, opredeljeno v standardu EN 17547 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje vitaminov A, E in D ⁽¹⁾ – Metoda z ekstrakcijo na trdno fazo (SPE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV- ali fluorescenčnega detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 9.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni vitamina A (retinola) v krmi. Vitamin A vključuje celoten *trans*-retinil alkohol in njegove *cis* izomere, ki se določajo s to metodo. Vsebnost vitamina A se izrazi v mednarodnih enotah (IU) na kg. Ena IU ustreza aktivnosti 0,300 µg celotnega *trans*-vitamin A alkohola ali 0,344 µg acetata celotnega *trans*-vitamina A ali 0,550 µg palmitata celotnega *trans*-vitamina A.

Meja kvantifikacije je 2 000 IU vitamina A/kg.

2. Načelo

Vzorec se hidrolizira z raztopino etanolnega kalijevega hidroksida, vitamin A pa se ekstrahira v petroleter. Topilo se odstrani z uparivanjem, ostanek pa raztopi v metanolu in po potrebi razredči do zahtevane koncentracije. Vsebnost vitamina A se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV- ali fluorescenčnega detektorja. Kromatografski parametri se izberejo tako, da se celoten *trans*-vitamin A alkohol in njegovi *cis* izomeri ne ločijo.

3. Reagenti

- 3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petroleter, vrelišče 40 °C-60 °C.
- 3.3 Metanol.
- 3.4 Raztopina kalijevega hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5 Raztopina natrijevega askorbata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (glej točko 7.7).
- 3.6 Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1 Raztopina natrijevega sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ v glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (za $x = 9$) (glej točko 7.8).
- 3.7 Raztopina fenoltaleina, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ v etanolu (točka 3.1).
- 3.8 2-propanol.
- 3.9 Mobilna faza za HPLC: mešanica metanola (točka 3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v). Točno razmerje bo določeno glede na značilnosti uporabljene kolone.
- 3.10 Dušik, brez kisika.

⁽¹⁾ Analizna metoda, opredeljena v standardu EN 17547, se obravnava kot alternativna metoda, ki se uporablja za namene uradnega nadzora za določevanje vitaminov A in E namesto metode, opisane za določanje vitamina A v delu A te priloge in za vitamin E dela B te priloge.

- 3.11 Acetat celotnega *trans*-vitamina A, posebne čistosti, certificirane aktivnosti, npr. $2,80 \times 10^6$ IU/g.
- 3.11.1 Osnovna raztopina acetata celotnega *trans*-vitamina A: 50 mg acetata vitamina A (točka 3.11) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v 2-propanolu (točka 3.8) in dopolni do oznake z istim topilom. Nominalna koncentracija te raztopine je 1 400 IU vitamina A na ml. Točno vsebnost je treba določiti v skladu s točko 5.6.3.1.
- 3.12 Palmitat celotnega *trans*-vitamina A, posebne čistosti, certificirane aktivnosti, npr. $1,80 \times 10^6$ IU/g.
- 3.12.1 Osnovna raztopina palmitata celotnega *trans*-vitamina A: 80 mg palmitata vitamina A (točka 3.12) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v 2-propanolu (točka 3.8) in dopolni do oznake z istim topilom. Nominalna koncentracija te raztopine je 1 400 IU vitamina A na ml. Točno vsebnost je treba določiti v skladu s točko 5.6.3.2.
- 3.13 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (glej točko 7.5)
4. **Naprava**
- 4.1 Vakuumski rotavapor.
- 4.2 Rjava steklovina.
- 4.2.1 Bučke z ravnim dnom ali erlenmajerice, 500-mililitrske, z brušenim vratom.
- 4.2.2 Merilne bučke z zamaški iz brušenega stekla, z ozkim vratom, 10-, 25-, 100- in 500-mililitrske.
- 4.2.3 Liji ločniki, konusni, 1 000-mililitrski, z zamaški iz brušenega stekla.
- 4.2.4 Hruškaste bučke, 250-mililitrske, z zamaški iz brušenega stekla.
- 4.3 Allihnov kondenzator, z dolžino obroča 300 mm z brušenim vratom in z nastavkom za dovodno cev plina.
- 4.4 Naguban filtrirni papir za ločevanje faz, premera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5 Oprema HPLC s sistemom vbrizgavanja
- 4.5.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, polnitev 5 μ m ali 10 μ m ali enakovredna (kriterij za zmogljivost: samo en vrh za vse izomere retinola pod pogoji kromatografije HPLC)
- 4.5.2 UV- ali fluorescenčni detektor s spremenljivo nastavitvijo valovne dolžine
- 4.6 Spektrofotometer z 10 mm kvarčnimi kivetami
- 4.7 Vodna kopel z magnetnim mešalom
- 4.8 Naprava za ekstrakcijo (glej sliko 1), sestavljena iz:
- 4.8.1 steklenega valja s kapaciteto 1 litra, opremljenega z vratom iz brušenega stekla in zamaškom;
- 4.8.2 Vložka iz brušenega stekla s stransko ročico in nastavljivo cevjo, ki gre skozi središče. Nastavljiva cev ima spodnji del v obliki črke U in vbrizg na nasprotnem koncu, tako da vrhnja plast tekočine v valju lahko preide v lij ločnik.

5. Postopek

Opomba: Vitamin A je občutljiv na (UV) svetlobo in oksidacijo. Vsi postopki se izvajajo brez svetlobe (z uporabo rjave steklovine ali steklene posode, zaščitene v aluminijasto folijo) in kisika (spiranje z dušikom). Med ekstrakcijo se zrak nad tekočino zamenja z dušikom (previsokemu tlaku se izogne z občasnim rahljanjem zamaška).

5.1 Priprava vzorca

Vzorec se zdrobi tako, da preide skozi 1 mm sito, pri čemer se je treba izogibati nastanku toplote. Drobljenje se mora izvesti neposredno pred tehtanjem in umiljenjem, drugače lahko pride do izgube vitamina A. Vzorci se ne drobijo, če je porazdelitev delcev glede na velikost ustrezna (npr. premiksi in krmni dodatki).

5.2 Umiljenje

Glede na vsebnost vitamina A se natehta 2 g–25 g vzorca na 1 mg natančno in prenese v 500-mililitrsko bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (točka 4.2.1). V primeru nizkih koncentracij se masa vzorca lahko poveča za zagotovitev zadostne količine delcev v preskusnem deležu. Med obračanjem se postopoma doda 130 ml etanola (točka 3.1), približno 100 mg BHT (točka 3.13), 2 ml raztopine natrijevega askorbata (točka 3.5) in 2 ml raztopine natrijevega sulfida (točka 3.6). Na bučko se namesti kondenzator (točka 4.3), bučka pa se potopi v vodno kopel z magnetnim mešalom (točka 4.7). Segreje se do vretja in 5 minut pusti pod povratnim hladilnikom. Nato se skozi kondenzator doda 25 ml raztopine kalijevega hidroksida (točka 3.4) in pusti pod povratnim hladilnikom (točka 4.3) nadaljnjih 25 minut, z mešanjem pod rahlim pretokom dušika. Nato se kondenzator spere s približno 20 ml vode, vsebina bučke pa ohladi na sobno temperaturo.

5.3 Ekstrakcija

Z dekantiranjem se raztopina za umiljenje kvantitativno prenese v 1 000-mililitrski lij ločnik (točka 4.2.3) ali napravo za ekstrakcijo (točka 4.8), tako da se spere s skupno 250 ml vode. Nato se bučka za umiljenje spere s 25 ml etanola (točka 3.1) in 100 ml petroletra (točka 3.2), izpirki pa se prenesejo v lij ločnik ali napravo za ekstrakcijo. Razmerje vode in etanola v združenih raztopinah mora biti približno 2:1. 2 minuti se močno stresa in nato 2 minuti pusti, da se umiri.

5.3.1 Ekstrakcija z lijem ločnikom (točka 4.2.3)

Ko so plasti ločene (glej točko 7.3), se plast petroletra prenese v drug lij ločnik (točka 4.2.3). Ekstrakcija se ponovi dvakrat s 100 ml petroletra (točka 3.2) in dvakrat s 50 ml petroletra (točka 3.2).

Združene ekstrakte v liju ločniku se med rahlim pretresanjem (da se prepreči nastanek emulzij) dvakrat spere s po 100 ml vode in nato s ponavljajočim se stresanjem ponovno s po 100 ml vode, dokler voda pri dodajanju raztopine fenolftaleina (točka 3.7) ne ostane brezbarvna (navadno zadošča štirikratno spiranje). Sprani ekstrakt se filtrira skozi suh naguban filter za ločevanje faz (točka 4.4) v 500-mililitrsko merilno bučko (točka 4.2.2), da se odstrani suspendirana voda. Lij ločnik in filter se spereta s 50 ml petroletra (točka 3.2), dopolni se do oznake s petroletrrom (točka 3.2) in dobro premeša.

5.3.2 Ekstrakcija z uporabo naprave za ekstrakcijo (točka 4.8)

Ko se plasti ločijo (glej točko 7.3), se zamašek steklenega valja (točka 4.8.1) zamenja z vložkom iz brušenega stekla (točka 4.8.2), spodnji del nastavljuje cevi pa se namesti v obliki črke U tik nad raven vmesnika. S tlakom, ki ga tvori dušik v stranski ročici, se zgornja plast petroletra prenese v 1 000-mililitrski lij ločnik (točka 4.2.3). V stekleni valj se doda 100 ml petroletra (točka 3.2), zamaši se in dobro pretrese. Počaka se, da se plasti ločijo, zgornja plast pa se prenese v lij ločnik tako kot prej. Postopek ekstrakcije se ponovi s 100 ml petroletra (točka 3.2), nato dvakrat s po 50 ml petroletra (točka 3.2), plasti petroletra pa se dodajo v lij ločnik.

Združeni ekstrakti petroletra se sperejo, kakor je opisano v točki 5.3.1, nato pa se nadaljuje, kakor je navedeno v navedeni točki.

5.4 Priprava vzorčne raztopine za HPLC

Alikvot raztopine petroletra (iz točke 5.3.1 ali 5.3.2) se odpipetira v 250-mililitrsko hruškasto bučko (točka 4.2.4). Topilo uparimo skoraj do suhega v rotavaporju (točka 4.1) pri znižanem tlaku pri temperaturi kopeli, ki ne presega 40 °C. Atmosferski tlak se vzpostavi z dovajanjem dušika (točka 3.10), bučka pa se odstrani iz rotavaporja. Preostalo topilo se odstrani s tokom dušika (točka 3.10), ostanek pa se takoj raztopi v znanem volumnu (10 ml–100 ml) metanola (točka 3.3) (koncentracija vitamina A mora biti v območju od 5 IU/ml do 30 IU/ml).

5.5 Določanje s HPLC

Vitamin A se loči na koloni C₁₈ z reverzno fazo (točka 4.5.1), koncentracija pa se izmeri z UV-detektorjem (325 nm) ali fluorescenčnim detektorjem (ekscitacija: 325 nm, emisija: 475 nm) (točka 4.5.2).

Vbrizga se alikvot (npr. 20 µl) raztopine metanola, ki nastane pri točki 5.4, in eluira z mobilno fazo (točka 3.9). Izračuna se srednja vrednost višine (površine) vrhov za več vbrizgov iste vzorčne raztopine in srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov raztopin za umerjanje (točka 5.6.2).

Pogoji za HPLC

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernica; lahko se uporabljajo tudi drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , polnitev 5 ali 10 µm ali enakovredna.
Mobilna faza (točka 3.9):	mešanica metanola (točka 3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v).
Hitrost pretoka:	1–2 ml/min.
Detektor (točka 4.5.2):	UV-detektor (325 nm) ali fluorescenčni detektor (ekscitacija: 325 nm / emisija: 475 nm)

5.6 Umerjanje

5.6.1 Priprava delovnih standardnih raztopin

20 ml osnovne raztopine acetata vitamina A (točka 3.11.1) ali 20 ml osnovne raztopine palmitata vitamina A (točka 3.12.1) se odpipetira v 500-mililitrsko bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (točka 4.2.1) ter hidrolizira, kakor je navedeno v točki 5.2, vendar brez dodatka BHT. Nato se ekstrahira s petroletrom (točka 3.2) v skladu s točko 5.3 in dopolni do 500 ml s petroletrom (točka 3.2). 100 ml tega ekstrakta se upari v rotavaporju (glej točko 5.4) skoraj do suhega, odstrani se preostalo topilo s tokom dušika (točka 3.10), ostanek pa se ponovno raztopi v 10,0 ml metanola (točka 3.3). Nominalna koncentracija te raztopine je 560 IU vitamina A na ml. Točno vsebnost je treba določiti v skladu s točko 5.6.3.3. Delovno standardno raztopino je treba pripraviti svežo pred uporabo.

2,0 ml te delovne standardne raztopine se odpipetira v 20-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z metanolom (točka 3.3) do oznake in premeša. Nominalna koncentracija te razredčene delovne standardne raztopine je 56 IU vitamina A na ml.

5.6.2 Priprava raztopin za umerjanje in umeritvena krivulja

1,0, 2,0, 5,0 in 10,0 ml razredčene delovne standardne raztopine se prenese v serijo 20-mililitrskih merilnih bučk, dopolni se z metanolom (točka 3.3) do oznake in premeša. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,8, 5,6, 14,0 in 28,0 IU vitamina A na ml.

Večkrat se vbrizga 20 µl vsake raztopine za umerjanje, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov se pripravi umeritvena krivulja ob upoštevanju rezultatov UV-kontrole (točka 5.6.3.3).

5.6.3 UV-standardizacija standardnih raztopin

5.6.3.1 Osnovna raztopina acetata vitamina A

2,0 ml osnovne raztopine acetata vitamina A (točka 3.11.1) se odpipetira v 50 ml merilno bučko (točka 4.2.2) in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 56 IU vitamina A na ml. 3,0 ml te razredčene raztopine acetata vitamina A se odpipetira v 25-mililitrsko merilno bučko in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmeri se UV-spekter te raztopine proti 2-propanolu (točka 3.8) v spektrofotometru (točka 4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ za acetat vitamina A} = 1\,530 \text{ pri } 326 \text{ nm v } 2 - \text{propanolu})$$

5.6.3.2 Osnovna raztopina palmitata vitamina A

2,0 ml osnovne raztopine palmitata vitamina A (točka 3.12.1) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko (točka 4.2.2) in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 56 IU vitamina A na ml. 3,0 ml te razredčene raztopine palmitata vitamina A se odpipetira v 25-mililitrsko merilno bučko in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmeri se UV-spekter te raztopine proti 2-propanolu (točka 3.8) v spektrofotometru (točka 4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ za palmitat vitamina A} = 957 \text{ pri } 326 \text{ nm v } 2 - \text{propanolu})$$

5.6.3.3 Delovna standardna raztopina vitamina A

3,0 ml nerazredčene delovne standardne raztopine vitamina A, pripravljene v skladu s točko 5.6.1, se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko (točka 4.2.2) in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. 5,0 ml te raztopine se odpipetira v 25-mililitrsko merilno bučko in dopolni z 2-propanolom (točka 3.8) do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IU vitamina A na ml. Izmeri se UV-spekter te raztopine proti 2-propanolu (točka 3.8) v spektrofotometru (točka 4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

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

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

6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov vitamina A iz vzorčne raztopine se s pomočjo umeritvene krivulje (točka 5.6.2) določi koncentracija vzorčne raztopine v IU/ml.

Vsebnost vitamina A (w) v vzorcu, izražena v IU/kg, se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je:

c = koncentracija vitamina A (točka 5.4) v IU/ml v vzorčni raztopini

V₁ = volumen vzorčne raztopine (točka 5.4) v ml

V_2 = volumen alikvota, uporabljenega pri točki 5.4, v ml

m = masa preskusnega deleža v gramih

7. Opombe

7.1 Pri vzorcih z nizko koncentracijo vitamina A se ekstrakte petroletra iz dveh umilitvenih šarž (natehtana količina: 25 g) lahko združi v eno vzorčno raztopino za določanje s HPLC.

7.2 Masa vzorca za analizo ne vsebuje več kot 2 g maščobe.

7.3 Če se fazi ne ločita, se doda približno 10 ml etanola (točka 3.1) za razbitje emulzije.

7.4 Pri ribjem olju in drugih čistih maščobah se čas umiljenja podaljša na 45–60 minut.

7.5 Namesto BHT se lahko uporablja hidrokinon.

7.6 Z običajno fazno kolono je možno ločiti izomere retinola. Vendar je pri tem treba za izračune zabeležiti vse višine (površine) vrhov vseh cis in trans izomerov.

7.7 Namesto raztopine natrijevega askorbata se lahko uporabi približno 150 mg askorbinske kisline.

7.8 Namesto raztopine natrijevega sulfida se lahko uporabi približno 50 mg EDTA.

7.9 Pri analizi vitamina A v mlečnih nadomestkih je treba paziti:

- pri umiljenju (točka 5.2): zaradi količine maščobe v vzorcu je lahko potrebna večja količina raztopine kalijevega hidroksida (točka 3.4),
- pri ekstrakciji (točka 5.3): zaradi prisotnosti emulzij je morda potrebna sprememba razmerja voda/etanol 2:1.

Da se preveri, ali uporabljena analizna metoda zagotavlja zanesljive rezultate glede tega specifičnega matriksa (mlečni nadomestek), je treba na dodatnem preskusnem deležu izvesti preskus izkoristka. Če je izkoristek nižji od 80 %, se pri analiznem rezultatu uporabi popravek za izkoristek.

8. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % relativno glede na višji rezultat.

9. Rezultati medlaboratorijske študije ⁽²⁾

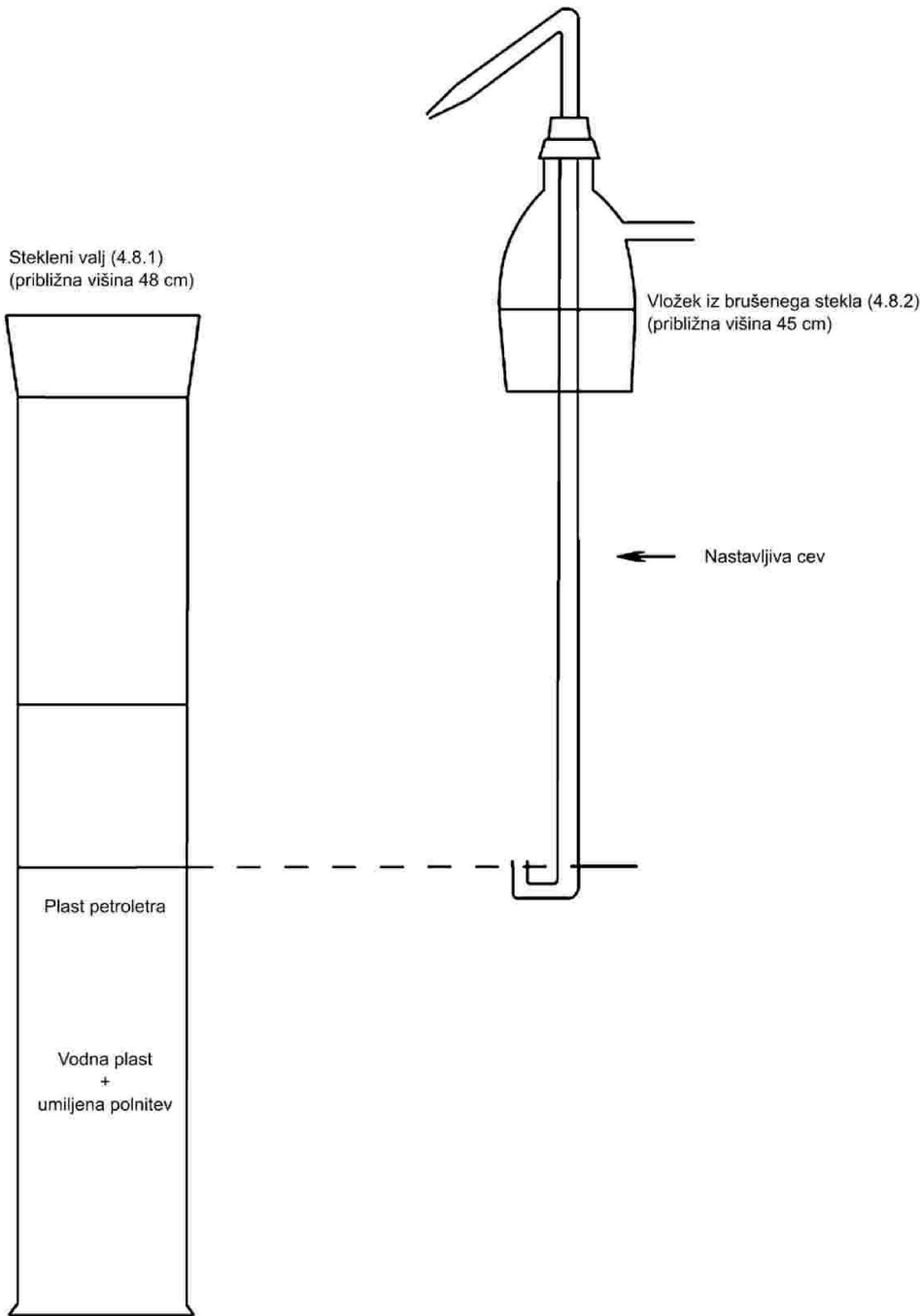
	Premiks	Predpripravljena krma	Mineralni koncentrat	Beljakovinska krma	Krma za pujske
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Srednja vrednost [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119

⁽²⁾ Izvedla delovna skupina za krmo Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L:	število laboratorijev				
n:	število posameznih vrednosti				
sr:	standardni odmik ponovljivosti				
sR:	standardni odmik obnovljivosti				
r:	ponovljivost				
R:	obnovljivost				
CVr:	koeficient variacije ponovljivosti				
CVR:	koeficient variacije obnovljivosti				

Slika 1

Napravo za ekstrakcijo (točka 4.8)



B. DOLOČANJE VITAMINA E

Vitamin E se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 17547 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje vitaminov A, E in D ⁽³⁾ – Metoda z ekstrakcijo na trdno fazo (SPE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV- ali fluorescenčnega detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 9.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni vitamina E v krmi. Vsebnost vitamina E se izrazi v mg acetata DL- α -tokoferola na kg. 1 mg acetata DL- α -tokoferola ustreza 0,91 mg DL- α -tokoferola (vitamina E).

Meja kvantifikacije je 2 mg vitamina E/kg. Ta meja kvantifikacije se lahko doseže le s fluorescenčnim detektorjem. Meja kvantifikacije za UV-detektor je 10 mg/kg.

2. Načelo

Vzorec se hidrolizira z etanolno raztopino kalijevega hidroksida, vitamin E pa se ekstrahira v petroleter. Topilo se odstrani z uparjanjem, ostanek pa raztopi v metanolu in po potrebi razredči do zahtevane koncentracije. Vsebnost vitamina E se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV- ali fluorescenčnega detektorja.

3. Reagenti

- 3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2 Petroleter, vrelišče $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3.3 Metanol.
- 3.4 Raztopina kalijevega hidroksida, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$.
- 3.5 Raztopina natrijevega askorbata, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (glej točko 7.7).
- 3.6 Natrijev sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1 Raztopina natrijevega sulfida, $c = 0,5\text{ mol/l}$ v glicerolu, $\beta = 120\text{ g/l}$ (za $x = 9$) (glej točko 7.8).
- 3.7 Raztopina fenoltaleina, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ v etanolu (točka 3.1).
- 3.8 Mobilna faza za HPLC: mešanica metanola (točka 3.3) in vode, npr. $980 + 20\text{ (v + v)}$. Točno razmerje bo določeno glede na značilnosti uporabljene kolone.
- 3.9 Dušik, brez kisika.
- 3.10 Acetat DL- α -tokoferola, posebne čistosti, certificirane aktivnosti.
- 3.10.1 Osnovna raztopina acetata DL- α -tokoferola: 100 mg acetata DL- α -tokoferola (točka 3.10) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v etanolu (točka 3.1) in dopolni z istim topilom do oznake. 1 ml te raztopine vsebuje 1 mg acetata DL- α -tokoferola. (Za UV-kontrolo glej točko 5.6.1.3, za stabilizacijo pa točko 7.4.).

⁽³⁾ Analizna metoda, opredeljena v standardu EN 17547, se obravnava kot alternativna metoda, ki se uporablja za namene uradnega nadzora za določevanje vitaminov A in E namesto metode, opisane za določanje vitamina A v delu A te priloge in za vitamin E dela B te priloge.

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

3.11.1 Osnovna raztopina DL- α -tokoferola: 100 mg DL- α -tokoferola (točka 3.11) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v etanolu (točka 3.1) in dopolni z istim topilom do oznake. 1 ml te raztopine vsebuje 1 mg DL- α -tokoferola. (Za UV-kontrolo glej točko 5.6.2.3, za stabilizacijo pa točko 7.4.).

3.12 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (glej točko 7.5).

4. **Naprava**

4.1 Rotacijski uparjalnik.

4.2 Rjava steklovina.

4.2.1 Bučke z ravnim dnem ali erlenmajerice, 500-mililitrske, z brušenim vratom.

4.2.2 Merilne bučke z zamaški iz brušenega stekla, z ozkim vratom, 10-, 25-, 100- in 500-mililitrske.

4.2.3 Liji ločniki, konusni, 1 000-mililitrski, z zamaški iz brušenega stekla.

4.2.4 Hruškaste bučke, 250-mililitrske, z zamaški iz brušenega stekla.

4.3 Allihnov kondenzator, z dolžino obroča 300 mm z brušenim vratom in z nastavkom za dovodno cev plina.

4.4 Naguban filtrirni papir za ločevanje faz, premera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5 Oprema HPLC s sistemom vbrizgavanja.

4.5.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, polnitev 5 ali 10 μ m ali enakovredna.

4.5.2 Fluorescenčni ali UV-detektor, s spremenljivo nastavitvijo valovne dolžine.

4.6 Spektrofotometer z 10 mm kvarčnimi kivetami.

4.7 Vodna kopel z magnetnim mešalom.

4.8 Naprava za ekstrakcijo (glej sliko 2), sestavljena iz:

4.8.1 steklenega valja s kapaciteto 1 litra, opremljenega z vratom iz brušenega stekla in zamaškom;

4.8.2 vložka iz brušenega stekla s stransko ročico in nastavljivo cevjo, ki gre skozi središče. Nastavljiva cev ima spodnji del v obliki črke U in vbrizg na nasprotnem koncu, tako da vrhnja plast tekočine v valju lahko preide v lij ločnik.

5. **Postopek**

Opomba: Vitamin E je občutljiv na (UV) svetlobo in oksidacijo. Vsi postopki se izvajajo brez svetlobe (z uporabo rjave steklovine ali steklene posode, zaščitene v aluminijasto folijo) in kisika (spiranje z dušikom). Med ekstrakcijo se zrak nad tekočino zamenja z dušikom (previsokemu tlaku se izogne z občasnim rahljanjem zamaška).

5.1 *Priprava vzorca*

Vzorec se zdrobi tako, da preide skozi 1 mm sito, pri čemer se je treba izogibati nastanku toplote. Drobljenje se mora izvesti neposredno pred tehtanjem in umiljenjem, drugače lahko pride do izgube vitamina E.

5.2 Umiljenje

Glede na vsebnost vitamina E se natehta 2 g–25 g vzorca na 0,01 g natančno in prenese v 500-mililitrsko bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (točka 4.2.1). Med obračanjem se postopoma dodajo 130 ml etanola (točka 3.1), približno 100 mg BHT (točka 3.12), 2 ml raztopine natrijevega askorbata (točka 3.5) in 2 ml raztopine natrijevega sulfida (točka 3.6). Na bučko se namesti kondenzator (točka 4.3), bučka pa se potopi v vodno kopel z magnetnim mešalom (točka 4.7). Segreje se do vretja in 5 minut pusti pod povratnim hladilnikom. Nato se skozi kondenzator (točka 4.3) doda 25 ml raztopine kalijevega hidroksida (točka 3.4) in se pusti pod povratnim hladilnikom še 25 minut, z mešanjem pod rahlim pretokom dušika. Nato se kondenzator spere s približno 20 ml vode, vsebina bučke pa ohladi na sobno temperaturo.

5.3 Ekstrakcija

Z dekantiranjem se raztopina za umiljenje kvantitativno prenese v 1 000-mililitrski lij ločnik (točka 4.2.3) ali napravo za ekstrakcijo (točka 4.8), tako da se spere s skupno 250 ml vode. Nato se bučka za umiljenje spere s 25 ml etanola (točka 3.1) in 100 ml petroletra (točka 3.2), izpirki pa se prenesejo v lij ločnik ali napravo za ekstrakcijo. Razmerje vode in etanola v združenih raztopinah mora biti približno 2:1. 2 minuti se močno stresa in nato 2 minuti pusti, da se umiri.

5.3.1 Ekstrakcija z lijem ločnikom (točka 4.2.3)

Ko so plasti ločene (glej točko 7.3), se plast petroletra prenese v drug lij ločnik (točka 4.2.3). Ekstrakcija se ponovi dvakrat s 100 ml petroletra (točka 3.2) in dvakrat s 50 ml petroletra (točka 3.2).

Združene ekstrakte v liju ločniku se med rahlim pretresanjem (da se prepreči nastanek emulzij) dvakrat spere s po 100 ml vode in nato s ponavljajočim se stresanjem ponovno s po 100 ml vode, dokler voda pri dodajanju raztopine fenolftaleina (točka 3.7) ne ostane brezbarvna (navadno zadošča štirikratno spiranje). Sprani ekstrakt se filtrira skozi suh naguban filter za ločevanje faz (točka 4.4) v 500-mililitrsko merilno bučko (točka 4.2.2), da se odstrani suspendirana voda. Lij ločnik in filter se spereta s 50 ml petroletra (točka 3.2), dopolni se do oznake s petroletrom (točka 3.2) in dobro premeša.

5.3.2 Ekstrakcija z uporabo naprave za ekstrakcijo (točka 4.8)

Ko se plasti ločijo (glej točko 7.3), se zamašek steklenega valja (točka 4.8.1) zamenja z vložkom iz brušenega stekla (točka 4.8.2), spodnji del nastavljive cevi pa se namesti v obliki črke U tik nad raven vmesnika. S tlakom, ki ga tvori dušik v stranski ročici, se zgornja plast petroletra prenese v 1 000-mililitrski lij ločnik (točka 4.2.3). V stekleni valj se doda 100 ml petroletra (točka 3.2), zamaši se in dobro pretrese. Počaka se, da se plasti ločijo, zgornja plast pa se prenese v lij ločnik tako kot prej. Postopek ekstrakcije se ponovi s 100 ml petroletra (točka 3.2), nato dvakrat s po 50 ml petroletra (točka 3.2), plasti petroletra pa se dodajo v lij ločnik.

Združeni ekstrakti petroletra se sperejo, kakor je opisano v točki 5.3.1, nato pa se nadaljuje, kakor je navedeno v navedeni točki.

5.4 Priprava vzorčne raztopine za HPLC

Alikvot raztopine petroletra (iz točke 5.3.1 ali 5.3.2) se odpipetira v 250-mililitrsko hruškasto bučko (točka 4.2.4). Topilo uparimo skoraj do suhega v rotavaporju (točka 4.1) pri znižanem tlaku pri temperaturi kopeli, ki ne presega 40 °C. Atmosferski tlak se vzpostavi z dovajanjem dušika (točka 3.9), bučka pa se odstrani iz rotavaporja. Preostalo topilo se odstrani v toku dušika (točka 3.9), ostanek pa se takoj raztopi v znanem volumnu (10 ml–100 ml) metanola (točka 3.3) (koncentracija DL- α -tokoferola mora biti 5–30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5 Določanje s HPLC

Vitamin E se loči na koloni C_{18} z reverzno fazo (točka 4.5.1), koncentracija pa se izmeri s fluorescenčnim detektorjem (ekscitacija: 295 nm, emisija: 330 nm) ali UV-detektorjem (292 nm) (točka 4.5.2).

Vbrizga se alikvot (npr. 20 µl) raztopine metanola, ki nastane pri točki 5.4, in eluira z mobilno fazo (točka 3.8). Izračunajo se srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov iste vzorčne raztopine in srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov raztopin za umerjanje (točka 5.6.2).

Pogoji za HPLC

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernica; lahko se uporabljajo tudi drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , polnitev 5 ali 10 µm ali enakovredna
Mobilna faza (točka 3.8):	mešanica metanola (točka 3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v).
Hitrost pretoka:	1–2 ml/min
Detektor (točka 4.5.2)	Fluorescenčni detektor (ekscitacija: 295 nm / emisija: 330 nm) ali UV detektor (292 nm)

5.6 Umerjanje (acetat DL-α-tokoferola ali DL-α-tokoferol)

5.6.1 Standardni acetat DL-α-tokoferola

5.6.1.1 Priprava delovne standardne raztopine

25 ml osnovne raztopine acetata DL-α-tokoferola (točka 3.10.1) se odpipetira v 500-mililitrsko bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (točka 4.2.1) in hidrolizira, kakor je opisano v točki 5.2. Nato se ekstrahira s petroletrom (točka 3.2) v skladu s točko 5.3 in dopolni do 500 ml s petroletrom. 25 ml tega ekstrakta se upari v rotavaporju (glej točko 5.4) skoraj do suhega, odstrani se preostalo topilo s tokom dušika (točka 3.9), ostanek pa se ponovno raztopi v 25,0 ml metanola (točka 3.3). Nominalna koncentracija te raztopine je 45,5 µg DL-α-tokoferola na ml, kar je enakovredno 50 µg acetata DL-α-tokoferola na ml. Delovno standardno raztopino je treba pripraviti svežo pred uporabo.

5.6.1.2 Priprava raztopin za umerjanje in umeritvena krivulja

1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml in 10,0 ml delovne standardne raztopine se prenese v serijo 20-mililitrskih merilnih bučk, dopolni se do oznake z metanolom (točka 3.3) in premeša. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,5, 5,0, 10,0 in 25,0 µg/ml acetata DL-α-tokoferola, tj. 2,28, 4,55, 9,10 in 22,8 µg/ml DL-α-tokoferola.

Večkrat se vbrizga 20 µl vsake raztopine za umerjanje, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov se pripravi umeritvena krivulja.

5.6.1.3 UV-standardizacija osnovne raztopine acetata DL-α-tokoferola (točka 3.10.1)

5,0 ml osnovne raztopine acetata DL-α-tokoferola (točka 3.10.1) se razredči na 25,0 ml z etanolom, UV-spekter te raztopine pa se izmeri glede na etanol (točka 3.1) v spektrofotometru (točka 4.6) med 250 nm in 320 nm.

Maksimalna absorpcija je pri 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ pri } 284 \text{ nm v etanolu}$$

Pri tem razredčenju mora biti vrednost ekstinkcije 0,84 do 0,88.

5.6.2 DL-α-tokoferol standard

5.6.2.1 Priprava delovne standardne raztopine

2 ml osnovne raztopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko, raztopi v metanolu (točka 3.3) in dopolni z metanolom do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 40 µg DL-α-tokoferola na ml, kar je enakovredno 44,0 µg acetata DL-α-tokoferola na ml. Delovno standardno raztopino je treba pripraviti svežo pred uporabo.

5.6.2.2 Priprava raztopin za umerjanje in umeritvena krivulja

1,0, 2,0, 4,0 in 10,0 ml delovne standardne raztopine se prenese v serijo 20-mililitrskih merilnih bučk, dopolni se do oznake z metanolom (točka 3.3) in premeša. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,0, 4,0, 8,0 in 20,0 µg/ml DL-α-tokoferola, tj. 2,20, 4,40, 8,79 in 22,0 µg/ml acetata DL-α-tokoferola.

Večkrat se vbrizga 20 µl vsake raztopine za umerjanje, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov se pripravi umeritvena krivulja.

5.6.2.3 UV-standardizacija osnovne raztopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1)

2,0 ml osnovne raztopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1) se razredči na 25,0 ml z etanolom, UV-spekter te raztopine pa se izmeri proti etanolu (točka 3.1) v spektrofotometru (točka 4.6) med 250 nm in 320 nm. Maksimalna absorpcija je pri 292 nm:

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

Pri tem razredčenju mora biti vrednost ekstinkcije 0,6.

6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višine (površine) vrhov vitamina E iz vzorčne raztopine se s pomočjo umeritvene krivulje (točka 5.6.1.2 ali 5.6.2.2) določi koncentracija vzorčne raztopine v µg/ml (izračunana kot acetat DL-α-tokoferola).

Vsebnost vitamina E (w) v mg/kg v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemer je:

- c = koncentracija vitamina E (kot acetata DL-α-tokoferola) v vzorčni raztopini (točka 5.4) v µg/ml
- V₁ = volumen vzorčne raztopine (točka 5.4) v ml
- V₂ = volumen alikvota, uporabljenega pri točki 5.4, v ml
- m = masa preskusnega deleža v gramih

7. Opombe

- 7.1 Pri vzorcih z nizko koncentracijo vitamina E se ekstrakti petroletra iz dveh umilitvenih šarž (natehtana količina: 25 g) združijo v eno vzorčno raztopino za določanje s HPLC.
- 7.2 Masa vzorca za analizo ne vsebuje več kot 2 g maščobe.
- 7.3 Če se fazi ne ločita, se doda približno 10 ml etanola (točka 3.1) za razbitje emulzije.
- 7.4 Po spektrofotometrični meritvi raztopine acetata DL-α-tokoferola ali raztopine DL-α-tokoferola v skladu s točko 5.6.1.3 oz. 5.6.2.3 se doda približno 10 mg BHT (točka 3.12) v raztopino (točka 3.10.1 ali 3.10.2), raztopina pa se hrani v hladilniku (hrani se lahko največ 4 tedne).
- 7.5 Namesto BHT se lahko uporablja hidrokinon.
- 7.6 Z običajno fazno kolono je možno ločiti α-, β-, γ- in δ-tokoferol.

- 7.7 Namesto raztopine natrijevega askorbata se lahko uporabi približno 150 mg askorbinske kisline.
- 7.8 Namesto raztopine natrijevega sulfida se lahko uporabi približno 50 mg EDTA.
- 7.9 Acetat vitamina E se v bazičnih pogojih hidrolizira zelo hitro, zato je zelo občutljiv na oksidacijo, zlasti v navzočnosti elementov v sledovih, kot sta železo in baker. Če raven vitamina E v premiksih presega 5 000 mg/kg, se vitamin E pri določanju lahko razgradi. Zato je za potrditev priporočena metoda HPLC z encimsko razgradnjo strukture vitamina E brez bazičnega umiljenja.
8. Ponovljivost
- Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % relativno glede na višji rezultat.
9. **Rezultati medlaboratorijske študije ⁽⁴⁾**

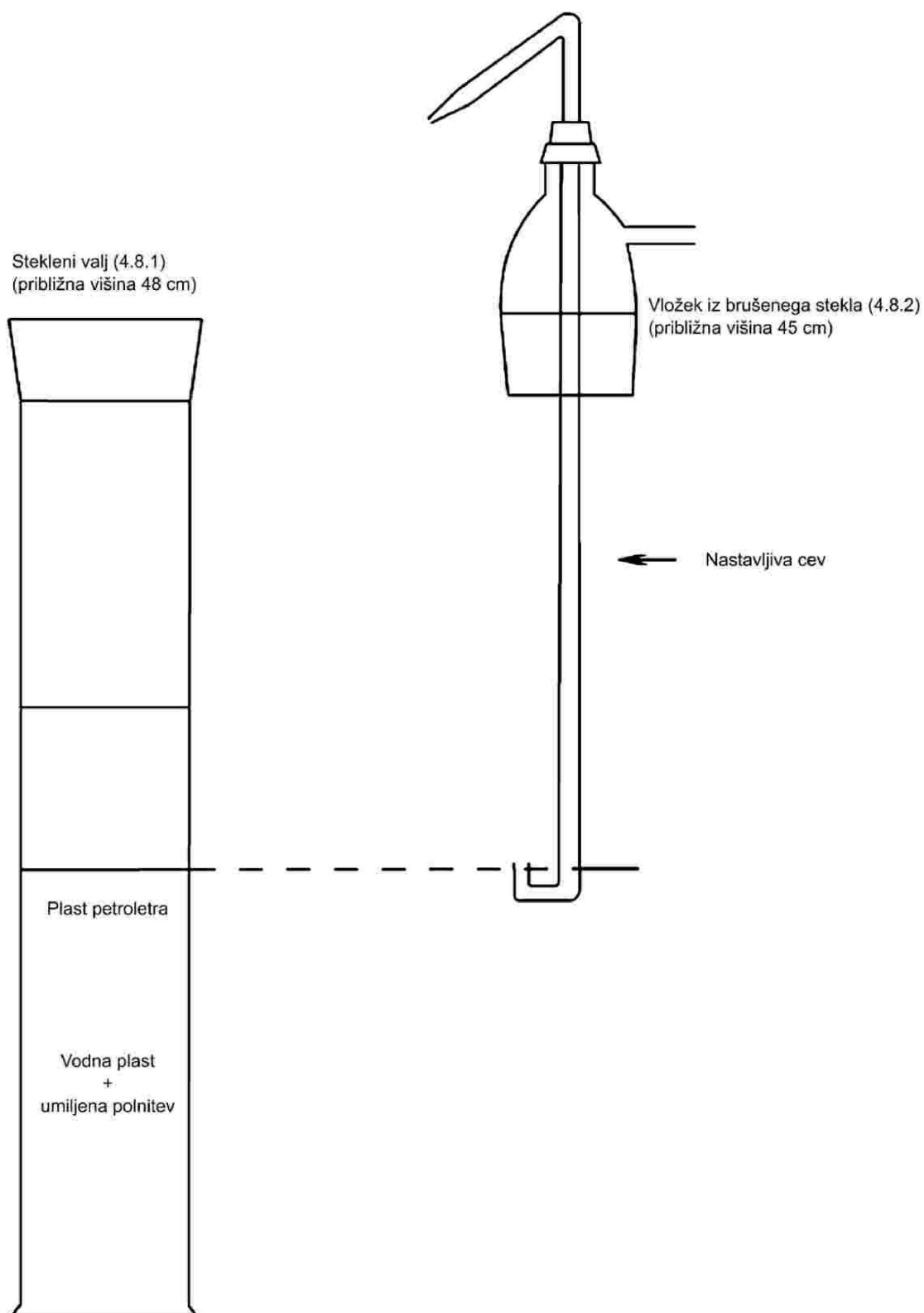
	Premiks	Predpripravljena krma	Mineralni koncentrat	Beljakovinska krma	Krma za pujske
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
srednja vrednost [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
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:	število laboratorijev
n:	število posameznih vrednosti
s _r :	standardni odmik ponovljivosti
s _R :	standardni odmik obnovljivosti
r:	ponovljivost
R:	obnovljivost
CV _r :	koeficient variacije ponovljivosti
CV _R :	koeficient variacije obnovljivosti

⁽⁴⁾ Izvedla delovna skupina za krmo Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Slika 2

Napravo za ekstrakcijo (točka 4.8)



C. DOLOČANJE ŽELEZA, BAKRA, MANGANA IN CINKA V SLEDIVIH

Vsebnost železa, bakra, mangana in cinka se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 15510 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, železa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena in svinca z ICP-AES, ali
- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 15621 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, žvepla, železa, cinka, bakra, mangana in kobalta po razklopu pod tlakom z ICP-AES, ali
- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 17053 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje elementov v sledovih, težkih kovin in drugih elementov v krmi z ICP-MS (večelementna metoda), ali
- analizno metodo, opredeljeno v standardu EN 6869 Krma – Določevanje kalcija, bakra, železa, magnezija, mangana, kalija, natrija in cinka – Metoda z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije, ali
- plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS), kot je opisana v točkah od 1 do 8 v nadaljnjem besedilu.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje železa, bakra, mangana in cinka v sledovih v krmi ^(*). Meje določljivosti so:

- železo (Fe): 20 mg/kg,
- baker (Cu): 10 mg/kg,
- mangan (Mn): 20 mg/kg,
- cink (Zn): 20 mg/kg.

2. Načelo

Po razkroju morebitnih organskih snovi se vzorec raztopi v klorovodikovi kislini. Po primernem razredčenju se z atomsko absorpcijsko spektrometrijo določijo železo, baker, mangan in cink.

3. Reagenti

Uvodne opombe

Za pripravo reagentov in raztopin za analizo se uporabi voda brez kationov, ki jih je treba določiti, ki se pripravi z dvojnimi destiliranjem vode v destilatorju iz borosilikatnega ali kremenovega stekla ali z dvojno ionsko izmenjavo.

Reagenti morajo biti vsaj analizno čisti. Odsotnost elementa, ki se določa, se preveri s slepim preskusom. Po potrebi se morajo reagenti dodatno prečistiti.

Namesto spodaj navedenih standardnih raztopin se lahko uporabijo komercialne standardne raztopine, če imajo jamstvo in so bile pred uporabo preverjene.

- 3.1 Klorovodikova kislina (d:1,19 g/ml).
- 3.2 Klorovodikova kislina (6 mol/liter).
- 3.3 Klorovodikova kislina (0,5 mol/liter).
- 3.4 38 do 40-odstotna (v/v) klorovodikova kislina z vsebnostjo železa (Fe) manj kot 1 mg/liter in z manj kot 10 mg (v obliki sulfata)/liter ostanka po izparevanju.

^(*) Ta metoda je bila validirana v okviru medlaboratorijskega preskušanja za različne krmne matrikse. Za več informacij je na voljo povezava <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5 Žveplova kislina (d: 1,84 g/ml).
- 3.6 Vodikov peroksid (približno 100 volumnov kisika (30 % po masi)).
- 3.7 Standardna raztopina železa (1 000 µg Fe/ml), pripravljena na naslednji način, ali enakovredna komercialno dostopna raztopina: 1 g železne žice se raztopi v 200 ml klorovodikove kisline v koncentraciji 6 mol/l (točka 3.2), doda se 16 ml vodikovega peroksida (točka 3.6) in dopolni z vodo do 1 litra.
- 3.7.1 Standardna delovna raztopina železa (100 µg Fe/ml), pripravljena z redčenjem enega dela standardne raztopine (točka 3.7) z 9 deli vode.
- 3.8 Standardna raztopina bakra (1 000 µg Cu/ml), pripravljena na naslednji način, ali enakovredna komercialno dostopna raztopina:
- 1 g bakra v prahu se raztopi v 25 ml klorovodikove kisline 6 mol/l (točka 3.2), doda se 5 ml vodikovega peroksida (točka 3.6) in dopolni z vodo do enega litra.
- 3.8.1 Standardna delovna raztopina bakra (10 µg Cu/ml), pripravljena z redčenjem 1 dela standardne raztopine (točka 3.8) z 9 deli vode, nato pa z redčenjem 1 dela nastale raztopine z 9 deli vode.
- 3.9 Standardna raztopina mangana (1 000 µg Mn/ml), pripravljena na naslednji način, ali enakovredna komercialno dostopna raztopina:
- 1 g mangana v prahu se raztopi v 25 ml klorovodikove kisline 6 mol/l (točka 3.2) in dopolni z vodo do enega litra.
- 3.9.1 Standardna delovna raztopina mangana (10 µg Mn/ml), pripravljena z redčenjem 1 dela standardne raztopine (točka 3.9) z 9 deli vode, nato pa z redčenjem 1 dela nastale raztopine z 9 deli vode.
- 3.10 Standardna raztopina cinka (1 000 µg Zn/ml), pripravljena na naslednji način, ali enakovredna komercialno dostopna raztopina:
- 1 g cinka v foliji ali granulah se raztopi v 25 ml klorovodikove kisline 6 mol/l (točka 3.2) in dopolni z vodo do enega litra.
- 3.10.1 Standardna delovna raztopina cinka (10 µg Zn/ml), pripravljena z redčenjem 1 dela standardne raztopine (točka 3.10) z 9 deli vode, nato pa z redčenjem 1 dela nastale raztopine z 9 deli vode.
- 3.11 Raztopina lantanovega klorida: 12 g lantanovega klorida se raztopi v 150 ml vode, doda se 100 ml klorovodikove kisline v koncentraciji 6 mol/l (točka 3.2) in dopolni z vodo do enega litra.
4. **Naprava**
- 4.1 Žarilna peč z regulacijo temperature in po možnosti rekorderjem.
- 4.2 Staklovina mora biti iz odpornega borosilikata, priporočljiva pa je uporaba naprave, ki je namenjena izključno določanju elementov v sledovih.
- 4.3 Atomski absorpcijski spektrofotometer, ki ustreza zahtevam metode glede občutljivosti in natančnosti zahtevanega območja.

5. Postopek ⁽⁶⁾

5.1 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi

5.1.1 Upepeljevanje in priprava raztopine za analizo ⁽⁷⁾

- 5.1.1.1 5 g–10 g vzorca se natehta na 0,2 mg natančno in prenese v žarilni lonček iz kvarca ali platine (glej opombo (b)), osuši v sušilniku pri 105 °C in postavi v hladno žarilno peč (točka 4.1). Peč se zapre (glej opombo (c)), potem pa se približno 90 minut postopoma viša temperatura na 450 °C do 475 °C. Ta temperatura se ohranja 4–16 ur (npr. čez noč), da se odstrani karbonatni material, nato pa se peč odpre in ohladi (glej opombo (d)).

Pepel se navlaži z vodo in prenese v 250-mililitrsko čašo. Lonček se spere s skupno približno 5 ml klorovodikove kisline (točka 3.1), vsebina pa se počasi in previdno prenese v čašo (lahko pride do burne reakcije zaradi nastanka CO₂). Po kapljicah se dodaja klorovodikova kislina (točka 3.1), meša pa se, dokler se ne preneha peniti. Upareva se do suhega, pri čemer se občasno premeša s stekleno palčko.

Nato se ostanku doda 15 ml klorovodikove kisline v koncentraciji 6 mol/l (točka 3.2) in približno 120 ml vode. Premeša se s stekleno paličico, ki se pusti v čaši, čaša pa se pokrije z urnim steklom. Počasi se segreva do vretja in pusti vreti do popolne raztopitve pepela. Skozi filter, ki ne vsebuje pepela, se filtrira v 250-mililitrsko merilno bučko. Čaša in filter se spereta s 5 ml klorovodikove kisline v koncentraciji 6 mol/l (točka 3.2) in dvakrat z vrelo vodo. Merilna bučka se napolni z vodo do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2 Če je preostanek na filtru videti črn (ogljik), se ponovno postavi v peč in ponovno upepeli pri 450 °C do 475 °C. Ta upepelitev, ki zahteva le nekaj ur (približno 3–5 ur), je končana, ko je pepel videti bel ali skoraj bel. Ostanek se raztopi s približno 2 ml klorovodikove kisline (točka 3.1), upari do suhega, nato pa se doda 5 ml 6 mol/l klorovodikove kisline (točka 3.2). Segreje se, raztopina se filtrira v merilno bučko in dopolni z vodo do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

Opombe:

- (a) Pri določanju elementov v sledovih je pomembno paziti zaradi tveganja onesnaženja, predvsem s cinkom, bakrom in železom. Zato oprema, ki se uporablja pri pripravi vzorcev, ne sme vsebovati teh kovin.

Za zmanjšanje splošnega tveganja onesnaženja je treba delati v brezprašnem prostoru s popolnoma čisto opremo in skrbno pometimi steklenimi posodami. Določanje cinka je posebej občutljivo na več vrst onesnaženja, npr. s stekleno posodo, reagenti, prahom itd.

- (b) Masa vzorca, ki se upepeli, se izračuna iz približne vsebnosti elementov v sledovih v krmi glede na občutljivost uporabljenega spektrofotometra. Pri nekateri krmi z nizko vsebnostjo elementov v sledovih je morda potrebno začeti z 10 g–20 g vzorca ter končno raztopino dopolniti do samo 100 ml.

- (c) Upepeljevanje se mora izvajati v zaprti peči brez dovajanja zraka ali kisika.

- (d) Temperatura na pirometru ne sme preseči 475 °C.

⁽⁶⁾ Lahko se uporabljajo druge metode za razgradnjo, če dokazano zagotavljajo podobne rezultate (kot je npr. mikrovalovni razklop).

⁽⁷⁾ V zeleni krmi (sveži ali posušeni) je lahko velika količina kremenca rastlinskega izvora, v katerem so lahko elementi v sledovih in ga je treba odstraniti. Pri vzorcih takšne krme je treba izvajati naslednji spremenjeni postopek. Postopki iz točke 5.1.1.1 se izvedejo do filtracije. Filtrirni papir, ki vsebuje netopen ostanek, se dvakrat spere z vrelo vodo in prenese v žarilni lonček iz kvarca ali platine. Prežari se v žarilni peči (točka 4.1) pri temperaturi pod 550 °C, dokler ves zogleneli material popolnoma ne izgine. Pusti se ohladiti, doda se nekaj kapljic vode in 10–15 ml klorovodikove kisline (točka 3.4), nato pa se upari do suhega pri približno 150 °C. Če v ostanku ostane kremen, se ponovno raztopi v nekaj mililitrih klorovodikove kisline (točka 3.4) in upari do suhega. Doda se pet kapljic žveplove kisline (točka 3.5) in segreva do prenehanja izhajanja belih hlapov. Po dodatku 5 ml klorovodikove kisline v koncentraciji 6 mol/l (točka 3.2) in približno 30 ml vode se segreva, raztopina se filtrira v 250-mililitrsko merilno bučko ter dopolni z vodo do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l). Nadaljuje se z določanjem v skladu s točko 5.1.2.

5.1.2 Določanje s spektrofotometrijo

5.1.2.1 Priprava raztopin za umerjanje

Za vsak element, ki se določa, se iz standardnih delovnih raztopin iz točk 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 in 3.10.1 pripravi serija raztopin za umerjanje, pri čemer je koncentracija HCl v vsaki približno 0,5 mol/l (in (pri železu, manganu in cinku) koncentracija lantanovega klorida, ki ustreza 0,1 % La (m/v)).

Izbrane koncentracije elementov v sledovih morajo ustrezati območju občutljivosti uporabljenega spektrofotometra. V tabelah spodaj so kot primer navedene sestave tipičnih območij raztopin za umeritev, odvisnih od vrste in občutljivosti spektrofotometra, ki se uporablja, zato bo morda treba izbrati drugačne koncentracije.

Železo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml delovne standardne raztopine (točka 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (točka 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (točka 3.11) in dopolniti z vodo do 100 ml							

Baker

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml delovne standardne raztopine (točka 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml delovne standardne raztopine (točka 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (točka 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (točka 3.11) in dopolniti z vodo do 100 ml							

Cink

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml delovne standardne raztopine (točka 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (točka 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (točka 3.11) in dopolniti z vodo do 100 ml							

5.1.2.2 Priprava raztopine za analizo

Za določanje bakra se lahko raztopina, pripravljena v skladu s točko 5.1.1, običajno uporabi neposredno. Če je treba koncentracijo prilagoditi območju umeritve, se ustrezen alikvot odpipetira v 100-mililitrsko merilno bučko in dopolni s klorovodikovo kislino 0,5 mol/l (točka 3.3) do oznake.

Za določanje železa, mangana in cinka se odpipetira ustrezen alikvot raztopine, pripravljene v skladu s točko 5.1.1, v 100-mililitrsko merilno bučko, doda se 10 ml raztopine lantanovega klorida (točka 3.11) in dopolni do oznake s klorovodikovo kislino 0,5 mol/l (3.3) (glej tudi točko 8 „Opomba“).

5.1.2.3 Slepi preskus

Slepi preskus mora vključevati vse predpisane korake postopka, le da se izpusti vzorčni material. Raztopina za umerjanje „0“ se ne sme uporabljati kot slepa raztopina.

5.1.2.4 Merjenje atomske absorpcije

Atomska absorpcija raztopin za umerjanje in raztopine, ki se analizira, se izmeri z uporabo oksidnega plamena zrak-acetilen pri naslednjih valovnih dolžinah:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Vsako merjenje se izvede štirikrat.

5.2 Mineralna krma

Če vzorec ne vsebuje organskih snovi, predhodno upepeljevanje ni potrebno. Nadaljuje se v skladu z drugim odstavkom točke 5.1.1.1. Uporevanje s klorovodikovo kislino se lahko izpusti.

6. Izračun rezultatov

Koncentracija elementa v sledovih v raztopini, ki se analizira, se izračuna s pomočjo umeritvene krivulje, rezultat pa se izrazi v miligramih elementa v sledovih na kilogram vzorca (ppm).

7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne presega:

- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti elementov v sledovih do 50 mg/kg;
- 10 % od višjega rezultata za vsebnosti elementov v sledovih od 50 do 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti elementov v sledovih od 100 do 200 mg/kg;
- 5 % višjega rezultata za vsebnosti zadevnega elementa v sledovih nad 200 mg/kg.

8. Opomba

Če je količina prisotnih fosfatov visoka, lahko moti določanje železa, mangana in cinka. To se mora popraviti z dodajanjem raztopine lantanovega klorida (točka 3.11). Če pa je masno razmerje v vzorcu (Ca + Mg/P) > 2, se lahko izpusti dodajanje raztopine lantanovega klorida (točka 3.11) raztopini za analizo in raztopinam za umerjanje.

D. DOLOČANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]l]-kvinazolin-4-(3H)-on hidrobromid

Vsebnost halofuginona se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določanje dovoljenih kokcidostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo (HPLC) z uporabo UV-detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 8.

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje ravni halofuginona v krmi. Meja določljivosti je 1 mg/kg.

2. **Načelo**

Po obdelavi z vročo vodo se halofuginon ekstrahira v obliki proste baze v etilni acetat in se nato kot hidroklorid loči v vodno raztopino kisline. Ekstrakt se prečisti z ionskoizmenjevalno kromatografijo. Vsebnost halofuginona se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo UV-detektorja.

3. **Reagenti**

3.1 Acetonitril, za HPLC.

3.2 Izmenjevalec amberlit XAD-2.

3.3 Amonijev acetat.

3.4 Etilacetat.

3.5 Led-ocetna kislina.

3.6 Standardna snov halofuginon (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]l]-kvinazolin-4-(3H)-on hidrobromid, E 764).

3.6.1 Osnovna standardna raztopina halofuginona, 100 µg/ml

50 mg halofuginona (točka 3.6) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 500-mililitrsko merilno bučko ter raztopi v pufrski raztopini amonijevega acetata (točka 3.18), dopolni se s pufrsko raztopino do oznake in premeša. Raztopina je stabilna tri tedne pri 5 °C, če jo hranimo v temi.

3.6.2 Raztopine za umerjanje

V serijo 100-mililitrskih merilnih bučk se prenese 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 in 6,0 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.6.1). Dopolni se z mobilno fazo (točka 3.21) do oznake in premeša. Te raztopine imajo koncentracije 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 oz. 6,0 µg/ml halofuginona. Te raztopine je treba pripraviti sveže pred uporabo.

3.7 Klorovodikova kislina, (ρ_{20} približno 1,16 g/ml).

3.8 Metanol.

3.9 Srebrov nitrat.

3.10 Natrijev askorbat.

3.11 Natrijev karbonat.

3.12 Natrijev klorid.

- 3.13 EDTA (etilendiamintetraocetna kislina, dinatrijeva sol).
- 3.14 Voda, za HPLC.
- 3.15 Raztopina natrijevega karbonata, $c = 10 \text{ g/100 ml}$.
- 3.16 Raztopina natrijevega klorida in nasičenega natrijevega karbonata, $c = 5 \text{ g/100 ml}$.
50 g natrijevega karbonata (točka 3.11) se raztopi v vodi, razredči do 1 litra, nato pa se doda natrijev klorid (točka 3.12), dokler raztopina ni nasičena.
- 3.17 Klorovodikova kislina, približno $0,1 \text{ mol/l}$
10 ml HCl (točka 3.7) se razredči z vodo do 1 litra.
- 3.18 Pufirska raztopina amonijevega acetata, približno $0,25 \text{ mol/l}$
19,3 g amonijevega acetata (točka 3.3) in 30 ml očetne kisline (točka 3.5) se raztopi v vodi (točka 3.14) ter razredči do 1 litra.
- 3.19 Priprava izmenjevalca Amberlite XAD-2
Ustrezna količina Amberlite (točka 3.2) se spira z vodo, dokler niso odstranjeni vsi kloridni ioni, kar dokazuje preskus s srebrovim nitratom (točka 3.20) v zavrženi vodni fazi. Nato se izmenjevalec spere s 50 ml metanola (točka 3.8), metanol se zavrže, izmenjevalec pa hrani v svežem metanolu.
- 3.20 Raztopina srebrovega nitrata, približno $0,1 \text{ mol/l}$
 $0,17 \text{ g}$ srebrovega nitrata (točka 3.9) se raztopi v 10 ml vode.
- 3.21 Mobilna faza HPLC
 500 ml acetonitrila (točka 3.1) se zmeša s 300 ml pufirske raztopine amonijevega acetata (točka 3.18) in 1 200 ml vode (točka 3.14). Vrednost pH se uravna na $4,3$ z očetno kislino (točka 3.5). Filtrira se skozi filter $0,22 \mu\text{m}$ (točka 4.8) in raztopina se razplini (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli). Ta raztopina je stabilna en mesec, če se hrani na temnem v zaprti posodi.
4. **Naprava**
- 4.1 Ultrazvočna kopel.
- 4.2 Rotacijski uparjalnik.
- 4.3 Centrifuga.
- 4.4 Oprema za HPLC z ultravijoličnim detektorjem z nastavljivo valovno dolžino ali detektorjem z diodnim nizom.
- 4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, $300 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, C_{18} , polnitev $10 \mu\text{m}$ ali enakovredna kolona.
- 4.5 Steklена kolona ($300 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) s filtrom iz sintranega stekla in petelinčkom.
- 4.6 Filtri iz steklenih vlaken, premera 150 mm .
- 4.7 Membranski filter, $0,45 \mu\text{m}$.
- 4.8 Membranski filter, $0,22 \mu\text{m}$.
5. **Postopek**
- Opomba* Halofuginon kot prosta baza je nestabilen v bazičnih in etilacetatnih raztopinah. V etilacetatu se ne pusti več kot 30 minut .
- 5.1 *Splošno*
- 5.1.1 Z analizo slepe krme se preveri, da niso prisotni niti halofuginon niti moteče snovi.

- 5.1.2 Preskus izkoristka se izvede z analizo slepe krme, ki se obogati s količino halofuginona, podobno količini v vzorcu. Za koncentracijo 3 mg/kg se k 10 g slepe krme doda 300 µl osnovne standardne raztopine (točka 3.6.1), premeša se in počaka 10 minut, preden se začne postopek ekstrakcije (točka 5.2).

Opomba: Pri tej metodi je vrsta slepe krme podobna vrsti vzorca, pri analizi pa se dokaže odsotnost halofuginona.

5.2 Ekstrakcija

10 g pripravljenega vzorca se natehta na 0,1 g natančno in prenese v 200-mililitrsko centrifugirno epruveto, doda se 0,5 g natrijevega askorbata (točka 3.10), 0,5 g EDTA (točka 3.13) in 20 ml vode ter premeša. Epruveta se postavi za 5 min v vodno kopel (80 °C). Po ohladitvi na sobno temperaturo se doda 20 ml raztopine natrijevega karbonata (točka 3.15) in premeša. Takoj se doda 100 ml etilacetata (točka 3.4) in 15 sekund ročno močno stresa. Nato se epruveta postavi za tri minute v ultrazvočno kopel (točka 4.1), zamašek pa zrahlja. Centrifugira se dve minuti, faza etilacetata pa se oddekanira skozi filter iz steklenih vlaken (točka 4.6) v 500-mililitrski lij ločnik. Ekstrakcija vzorca se ponovi z nadaljnjimi 100 ml etilacetata. Sestavljeni ekstrakti se spirajo eno minuto s 50 ml raztopine nasičenega natrijevega klorida-natrijevega karbonata (točka 3.16), vodna plast pa se zavrže.

Organska plast se ekstrahira 1 minuto s 50 ml klorovodikove kisline (točka 3.17). Spodnja kislinna plast se prenese v 250-mililitrski lij ločnik. Organska plast se ponovno ekstrahira 1,5 minute z nadaljnjimi 50 ml klorovodikove kisline, ekstrakt pa se združi s prvim ekstraktom. Združena ekstrakta se približno 10 sekund spirata z 10 ml etilacetata (točka 3.4) z vrtenjem.

Vodna plast se kvantitativno prenese v 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom, organska faza pa se zavrže. Ves preostali etilacetat iz kisle raztopine se upari v rotacijskem uparjalniku (točka 4.2). Temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40 °C. Ves preostali etil acetat se odstrani v 5 minutah v vakuumu pri približno 25 mbarih in 38 °C.

5.3 Čiščenje

5.3.1 Priprava kolone z Amberlitom

Kolona XAD-2 se pripravi za vsak ekstrakt vzorca. 10 g pripravljenega Amberlita (točka 3.19) se z metanolom (točka 3.8) prenese v stekleno kolono (točka 4.5). Na vrh posteljice izmenjevalca se položi majhen zamašek iz steklene volne. Metanol se izpusti iz kolone, izmenjevalec pa se spere s 100 ml vode tako, da se tok vode ustavi, ko vrh posteljice doseže izmenjevalec. Pred uporabo se pusti 10 minut, da se kolona uravnoteži. Kolona se ne sme nikoli izsušiti.

5.3.2 Čiščenje vzorca

Ekstrakt (točka 5.2) se kvantitativno prenese na vrh pripravljene kolone z Amberlitom (točka 5.3.1) in eluira, eluat pa se zavrže. Hitrost eluiranja ne sme biti večja od 20 ml/min. Bučka z okroglim dnom se spere z 20 ml klorovodikove kisline (točka 3.17) in vsebina se uporabi za spiranje izmenjalne kolone. Kakršna koli preostala raztopina kisline se prepiha z zrakom. Ostanek po izpiranju se zavrže. V kolono se doda 100 ml metanola (točka 3.8), 5–10 ml se eluira, eluat pa se zbere v 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Preostali metanol se pusti 10 minut, da se uravnoteži z izmenjevalcem, eluiranje pa se nadaljuje s hitrostjo, ki ne presega 20 ml/min, eluat pa se zbira v isto bučko z okroglim dnom. Metanol se upari na rotacijskem uparjalniku (točka 4.2), pri čemer temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40 °C. Ostanek se z mobilno fazo (točka 3.21) prenese v 10-mililitrsko merilno bučko. Dopolni se z mobilno fazo do oznake in premeša. Alikvot se prefiltrira skozi membranski filter (točka 4.7). Raztopina se shrani za določanje s HPLC (točka 5.4).

5.4 Določanje s HPLC

5.4.1 Parametri

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernice, lahko pa se uporabljajo drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.4.1)

Mobilna faza HPLC (točka 3.21)

Hitrost pretoka: 1,5–2 ml/min

Detekcijska valovna dolžina: 243 nm

Vbrizgani volumen: 40 to 100 µl

Stabilnost kromatografskega sistema se preveri z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umerjanje (točka 3.6.2) s koncentracijo 3,0 µg/ml, dokler se ne dosežejo konstantne višine (ali površine) vrhov in konstantni retencijski časi.

5.4.2 Umeritvena krivulja

Vsaka raztopina za umerjanje (točka 3.6.2) se vbrizga večkrat, za vsako koncentracijo pa se izmerijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Umeritvena krivulja se pripravi tako, da se na ordinato nanesejo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.4.3 Vzorčna raztopina

Ekstrakt vzorca (točka 5.3.2) se vbrizga večkrat, pri čemer se uporabijo enaki volumni kot za raztopino za umerjanje, nato pa se določi srednja vrednost višin (površin) vrhov halofuginona.

6. Izračun rezultatov

Koncentracija raztopine v µg/ml se določi iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov halofuginona v vzorčni raztopini iz umeritvene krivulje (točka 5.4.2).

Vsebnost halofuginona (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

pri čemer je:

c: koncentracija halofuginona v vzorčni raztopini v µg/ml,

m: masa preskusnega deleža v gramih.

7. Potrditev rezultatov

7.1 Identiteta

Identiteta analita se lahko potrdi z dodatno kromatografijo ali z detektorjem z diodnim nizom, s katerim se primerjata spekter ekstrakta vzorca in spekter raztopine za umerjanje (točka 3.6.2) s koncentracijo 6,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca se obogati z ustrezno količino raztopine za umerjanje (točka 3.6.2). Količina dodanega halofuginona mora biti podobna ocenjeni količini halofuginona v ekstraktu vzorca.

Povišan je le vrh halofuginona ob upoštevanju dodane količine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici maksimalne višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine.

7.1.2 Detekcija z diodnim nizom

Rezultati se ocenijo glede na naslednja merila:

- valovni dolžini maksimalne absorpcije spektra vzorca in spektra standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, morata biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo z diodnim nizom je to običajno znotraj ± 2 nm;

- (b) med 225 nm in 300 nm se spekter vzorca in spekter standarda, zabeležena na najvišji točki kromatografskega vrha, za navedene dela spektra ne smeta razlikovati znotraj območja 10 %–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje vrednosti in ko odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;
- (c) med 225 nm in 300 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, pridobljeni iz ekstrakta vzorca, za navedene dele spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 %–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje točke in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eno od teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatom dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,5 mg/kg za vsebnost halofuginona do 3 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec je izkoristek najmanj 80 %.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirana je bila medlaboratorijska študija ⁽⁸⁾, v kateri je osem laboratorijev analiziralo tri vzorce.

Rezultati

	Vzorec A (slepi) ob prejemu	Vzorec B (v prahu)		Vzorec C (v briketih)	
		ob prejemu	po 2 mesecih	ob prejemu	po 2 mesecih
Srednja vrednost [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 = ni zaznano

S_R = standardni odmik obnovljivosti

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti (v %)

Rec. = izkoristek (%)

E. DOLOČANJE ROBENIDINA

1,3-bis [(4-klorobenziliden)amino]gvanidin – hidroklorid

Vsebnost robenidina se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo UV-detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 8.

⁽⁸⁾ The Analyst 108, 1983, str. 1252–1256.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni robenidina v krmi. Meja določljivosti je 5 mg/kg.

2. Načelo

Vzorec se ekstrahira z nakisanim metanolom. Ekstrakt se osuši in alikvot se prečisti na koloni iz aluminijevega oksida. Robenidin se eluira s kolone z metanolom, koncentrira in dopolni z mobilno fazo do ustreznega volumna. Vsebnost robenidina se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo UV-detektorja.

3. Reagenti**3.1 Metanol.****3.2 Nakisani metanol**

4,0 ml klorovodikove kisline ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) se prenese v 500-mililitrsko merilno bučko, dopolni se do oznake z metanolom (točka 3.1) in premeša. Ta raztopina se pred vsako uporabo sveže pripravi.

3.3 Acetonitril, za HPLC.**3.4 Molekularno sito**

Tip 3A, kroglice 8 do 12 meš (kroglice, premera 1,6 mm–2,5 mm, kristalinični aluminijev silikat, premer por 0,3 mm).

3.5 Stopnja kislinske aktivnosti I aluminijevega oksida, za kolonsko kromatografijo

V primerno posodo se prenese 100 g aluminijevega oksida in doda 2,0 ml vode. Zamaši se in stresa približno 20 minut. Hrani se v dobro zaprti posodi.

3.6 Raztopina kalijevega dihidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l

3,40 g kalijevega dihidrogenfosfata se raztopi v vodi (za HPLC) v 1 000-mililitrski merilni bučki, dopolni se do oznake in premeša.

3.7 Raztopina di-natrijevega hidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l

3,55 g brezvodnega dinatrijevega hidrogenfosfata (ali 4,45 g dihidrata ali 8,95 g dodekahidrata) se raztopi v vodi (za HPLC) v litrski merilni bučki, dopolni se do oznake in premeša.

3.8 Mobilna faza HPLC

Zmešajo se naslednji reagenti:

650 ml acetonitrila (točka 3.3),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml raztopine kalijevega dihidrogenfosfata (točka 3.6),

50 ml raztopine dinatrijevega hidrogenfosfata (točka 3.7).

Filtrira se skozi filter 0,22 μm (točka 4.6), raztopina pa se nato razplini (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli).

3.9 Standardna snov

Čisti robenidin: 1,3-bis [(4-klorobenziliden)amino]gvanidin – hidroklorid

3.9.1 Osnovna standardna raztopina robenidina: 300 $\mu\text{g/ml}$

30 mg standardnega robenidina (točka 3.9) se natehta na 0,1 mg natančno. Raztopi se v nakisanem metanolu (točka 3.2) v 100-mililitrski merilni bučki, dopolni se z istim topilom do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo in hrani v temi.

3.9.2 Vmesna standardna raztopina robenidina: 12 µg/ml

10,0 ml osnovne standardne raztopine robenidina (točka 3.9.1) se prenese v 250-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z mobilno fazo (točka 3.8) do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo in hrani v temi.

3.9.3 Raztopine za umerjanje

V serijo 50-mililitrskih merilnih bučk se prenese 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 in 25,0 ml vmesne standardne raztopine (točka 3.9.2). Dopolni se z mobilno fazo (točka 3.8) do oznake in premeša. Te raztopine ustrezajo koncentracijam 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 oz. 6,0 µg/ml robenidina. Te raztopine je treba pripraviti sveže pred uporabo.

3.10 Voda, za HPLC.

4. **Naprava**

4.1 Steklena kolona

Iz rjavega stekla, s petelinčkom in rezervoarjem z volumnom približno 150 ml, notranjega premera 10 mm–15 mm, dolžine 250 mm.

4.2 Mehanični stresalnik ali magnetno mešalo.

4.3 Rotacijski uparjalnik.

4.4 Oprema za HPLC z ultravijoličnim detektorjem ali detektorjem z diodnim nizom, z nastavljivo valovno dolžino v območju 250 nm–400 nm

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo: 300 mm × 4 mm, C₁₈, polnitev 10 µm ali enakovredna.

4.5 Filtrski papir iz steklenih vlaken (Whatman GF/A ali enakovreden).

4.6 Membranski filter, 0,22 µm.

4.7 Membranski filter, 0,45 µm.

5. **Postopek**

Opomba: Robenidin je občutljiv na svetlobo. Pri vseh postopkih se uporablja rjava steklovina.

5.1 *Splošno*

5.1.1 Z analizo slepe krme se zagotovi, da niso prisotni niti robenidin niti moteče snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka se izvede z analizo slepe krme (točka 5.1.1), ki se obogati s količino robenidina, podobno količini v vzorcu. Za koncentracijo 60 mg/kg se 3,0 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.9.1) prenese v 250-mililitrsko erlenmajerico. Raztopina se upari v toku dušika do približno 0,5 ml. Doda se 15 g slepe krme, premeša, pusti 10 minut in nadaljuje z ekstrakcijo (točka 5.2).

Opomba: Pri tej metodi je vrsta slepe krme podobna vrsti vzorca in pri analizi se dokaže odsotnost robenidina.

5.2 *Ekstrakcija*

Približno 15 g vzorca se natehta na 0,01 g natančno. Prenese se v 250-mililitrsko erlenmajerico, doda se 100,0 ml nakisanega metanola (točka 3.2), zamaši se in stresa eno uro v stresalniku (točka 4.2). Raztopina se filtrira skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (točka 4.5) v 150-mililitrsko erlenmajerico. Doda se 7,5 g molekularnega sita (točka 3.4), zamaši se in stresa pet minut. Takoj se filtrira skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken. Ta raztopina se shrani za fazo čiščenja (točka 5.3).

5.3 Čiščenje

5.3.1 Priprava kolone z aluminijevim oksidom

V spodnji del steklene kolone se vstavi majhen zamašek iz steklene volne (točka 4.1), ki se potlači s stekleno palčko. 11,0 g pripravljenega aluminijevega oksida (točka 3.5) se natehta in prenese v kolono. Pazi se, da je pri tem postopku izpostavljenost zraku čim manjša. Rahlo se udarja po spodnjem delu polne kolone, da se aluminijev oksid sesede.

5.3.2 Čiščenje vzorca

Na kolono se s pipeto prenese 5,0 ml ekstrakta vzorca, pripravljenega v (točka 5.2). Pipeta se nasloni na steno kolone, nato pa se pusti, da se raztopina absorbira na aluminijev oksid. Robenidin se eluira iz kolone s 100 ml metanola (točka 3.1) s hitrostjo pretoka 2–3 ml/min, eluat pa se zbere v 250-mililitrsko bučko z okroglim dnom. Raztopina metanola se upari do suhega pri znižanem tlaku in pri 40 °C v rotacijskem uparjalniku (točka 4.3). Ostanek se raztopi v 3 ml–4 ml mobilne faze (točka 3.8) in prenese v 10-mililitrsko merilno bučko. Bučka se nekajkrat spere z 1 ml–2 ml mobilne faze, izpirki pa se prenesejo v merilno bučko. Dopolni se do oznake z istim topilom in premeša. Alikvot se prefiltrira skozi membranski filter 0,45 µm (točka 4.7). Ta raztopina se shrani za določanje s HPLC (točka 5.4).

5.4 Določanje s HPLC

5.4.1 Parametri

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernice, lahko pa se uporabljajo drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate:

kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.4.1),

mobilna faza HPLC (točka 3.8),

hitrost pretoka: 1,5– ml/min,

valovna dolžina detektorja: 317 nm,

vbrizgani volumen: 20 µl do 50 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema se preveri z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umerjanje (točka 3.9.3) s koncentracijo 3,6 µg/ml, dokler se ne dosežejo konstantne višine vrhov in konstantni retencijski časi.

5.4.2 Umeritvena krivulja

Vsaka raztopina za umerjanje (točka 3.9.3) se vbrizga večkrat, za vsako koncentracijo pa se izmerijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Umeritvena krivulja se pripravi tako, da se na ordinato nanesejo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.4.3 Vzorčna raztopina

Večkrat se vbrizga ekstrakt vzorca (točka 5.3.2) z enakimi volumni, kakor se uporabljajo pri raztopini za umerjanje, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina.

6. Izračun rezultatov

Koncentracija vzorčne raztopine v µg/ml se določi iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina iz umeritvene krivulje (točka 5.4.2).

Vsebnost robenidina (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

pri čemer je:

c = koncentracija robenidina v vzorčni raztopini v $\mu\text{g/ml}$,

m = masa preskusnega deleža v gramih.

7. Potrditev rezultatov

7.1 Identiteta

Identiteta analita se lahko potrdi z dodatno kromatografijo ali z detektorjem z diodnim nizom, s katerim se primerjata spekter ekstrakta vzorca in spekter raztopine za umerjanje (točka 3.9.3) s koncentracijo 6 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca se doda primerna količina raztopine za umerjanje (točka 3.9.3). Količina dodanega robenidina mora biti podobna ocenjeni količini robenidina v ekstraktu vzorca.

Povišan je le vrh robenidina ob upoštevanju dodane količine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove največje višine mora biti v mejah približno 10 % prvotne širine.

7.1.2 Detekcija z diodnim nizom

Rezultati se ocenijo glede na naslednja merila:

- (a) valovni dolžini maksimalne absorpcije spektra vzorca in spektra standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, morata biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo z diodnim nizom je to običajno v območju približno 2 nm;
- (b) med 250 nm in 400 nm se spekter vzorca in spekter standarda, zabeležena na najvišji točki kromatografskega vrha, za navedene dele spektra ne smeta razlikovati znotraj območja 10 %–100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje vrednosti in ko odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbanče standardnega analita;
- (c) med 250 nm in 400 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, pridobljeni iz ekstrakta vzorca, za navedene dele spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 %–100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje točke in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbanče spektra najvišje točke.

Če eno od teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % višjega rezultata za vsebnost robenidina nad 15 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec je izkoristek najmanj 85 %.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

EU je organizirala medlaboratorijsko študijo, pri kateri je 12 laboratorijev analiziralo štiri vzorce perutninske in kunčje krme v prahu in briketih. Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat. Rezultati so navedeni v spodnji tabeli:

	Perutninska krma		Kunčja krma	
	v prahu	v briketih	v prahu	v briketih
Srednja vrednost [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
Izkoristek [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = standardni odmik ponovljivosti

CV_r = koeficient variacije ponovljivosti, v %

S_R = standardni odmik obnovljivosti

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti, v %

F. DOLOČANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril

Vsebnost diklazurila se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidiostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo s ternarnim gradientom, z uporabo UV-detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 9.

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni diklazurila v krmnih mešanicah in premiksih ⁽⁹⁾. Meja določanja je 0,1 mg/kg, meja določljivosti pa 0,5 mg/kg. Lahko se dosežejo nižje meje določljivosti, vendar to mora potrditi uporabnik.

2. Načelo

Po dodatku internega standarda se vzorec ekstrahira z nakisanim metanolom. Pri krmi se alikvot ekstrakta prečisti na kartuši C18 za ekstrakcijo v trdni fazi. Diklazuril se eluira iz kartuše z mešanico nakisanega metanola in vode. Po uparevanju se ostanek raztopi v raztopini DMF in vode. Pri premiksah se ekstrakt upari in nato se ostanek raztopi v raztopini DMF in vode. Vsebnost diklazurila se določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo s ternarnim gradientom, z uporabo UV-detektorja.

3. Reagenti

- 3.1 Voda, za HPLC.
- 3.2 Amonijev acetat.
- 3.3 Tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBHS).
- 3.4 Acetonitril, za HPLC.
- 3.5 Metanol, za HPLC.
- 3.6 N, N-dimetilformamid (DMF).
- 3.7 Klorovodikova kislina, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8 Standardna snov: diklazuril: (+)-4-klorfenil [2,6-dikloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril, zajamčene čistosti

⁽⁹⁾ Ta metoda se lahko uporabi tudi za določanje diklazurila v posamičnih krmilih.

3.8.1 Osnovna standardna raztopina diklazurila, 500 µg/ml

25 mg standardne snovi diklazurila (točka 3.8) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 50-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z DMF (točka 3.6) do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo ali pa se uporabi rjava bučka ter shrani v hladilniku. Pri temperaturi, nižji od ali enaki 4 °C, je raztopina stabilna en mesec ⁽¹⁰⁾.

3.8.2 Standardna raztopina diklazurila, 50 µg/ml

5,00 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.8.1) se prenese v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z DMF (točka 3.6) do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo ali pa se uporabi rjava bučka ter shrani v hladilniku. Pri temperaturi, nižji od ali enaki 4 °C, je raztopina stabilna en mesec.

3.9 Snov, ki je interni standard: 2,6 dikloro- α -(4-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H) – il) α -metilbenzen-acetonitril (metil diklazuril).

3.9.1 Osnovna raztopina internega standarda, 500 µg/ml

25 mg internega standarda (točka 3.9) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 50-mililitrsko merilno bučko. Raztopi se v DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z DMF (točka 3.6) do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo ali pa se uporabi rjava bučka ter shrani v hladilniku. Pri temperaturi, nižji od ali enaki 4 °C, je raztopina stabilna en mesec.

3.9.2 Raztopina internega standarda, 50 µg/ml

5,00 ml osnovne raztopine internega standarda (točka 3.9.1) se prenese v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z DMF (točka 3.6) do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo ali pa se uporabi rjava bučka ter shrani v hladilniku. Pri temperaturi, nižji od ali enaki 4 °C, je raztopina stabilna en mesec.

3.9.3 Raztopina internega standarda za premikse, p/1 000 mg/ml (p = nominalna vsebnost diklazurila v premiksu v mg/kg).

p/10 mg internega standarda se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopi se v DMF (točka 3.6) v ultrazvočni kopeli (točka 4.7), dopolni se z DMF do oznake in premeša. Bučka se ovije v aluminijasto folijo ali pa se uporabi rjava bučka ter shrani v hladilniku. Pri temperaturi, nižji od ali enaki 4 °C, je raztopina stabilna en mesec.

3.10 Raztopine za umerjanje.

3.10.1 Raztopina za umerjanje, 1 µg/ml (diklazuril)

1,00 ml standardne raztopine diklazurila (točka 3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko. Doda se 17 ml DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z vodo (točka 3.1) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

3.10.2 Raztopina za umerjanje, 2 µg/ml (diklazuril)

2,00 ml standardne raztopine diklazurila (točka 3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko. Doda se 16 ml DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z vodo (točka 3.1) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

3.10.3 Raztopina za umerjanje, 3 µg/ml (diklazuril)

3,00 ml standardne raztopine diklazurila (točka 3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko. Doda se 15 ml DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z vodo (točka 3.1) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

⁽¹⁰⁾ Možna je daljša stabilnost (do 1 leta), vendar jo mora potrditi posamezni laboratorij.

3.10.4 Raztopina za umerjanje, 4 µg/ml (diklazuril)

4,00 ml standardne raztopine diklazurila (točka 3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko. Doda se 14 ml DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z vodo (točka 3.1) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

3.10.5 Raztopina za umerjanje, 5 µg/ml (diklazuril)

5,00 ml standardne raztopine diklazurila (točka 3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko. Doda se 13 ml DMF (točka 3.6), bučka se dopolni z vodo (točka 3.1) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

OPOMBA: Raztopine za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5) zajemajo koncentracijo diklazurila v krmi v višini od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg pri uporabi sedanjega protokola.

3.11 Ekstrakcijska kartuša za trdno fazo C₁₈, npr. Mega Bond Elut, velikost: 20 cc, masa sorbenta: 5 000 mg (predpriprava po smernicah dobavitelja).**3.12 Ekstrakcijsko topilo: nakisani metanol**

5,0 ml klorovodikove kisline (točka 3.7) se odpipetira v 1 000 ml metanola (točka 3.5) in premeša.

3.13 Mobilna faza za HPLC**3.13.1 Eluent A: raztopina amonijevega acetata in tetrabutilamonijevega hidrogen sulfata.**

5 g amonijevega acetata (točka 3.2) in 3,4 g TBHS (točka 3.3) se raztopi v 1 000 ml vode (točka 3.1) ter premeša.

3.13.2 Eluent B: acetonitril (točka 3.4).**3.13.3 Eluent C: metanol (točka 3.5).****4. Naprava****4.1 Mehanični stresalnik.****4.2 Oprema za HPLC s ternarnim gradientom:****4.2.1 Kolona za tekočinsko kromatografsko kolono, Hypersil ODS, polnitev 3 µm, 100 mm × 4,6 mm ali enakovredna****4.2.2 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino ali detektor z diodnim nizom****4.3 Rotacijski uparjalnik.****4.4 Membranski filter (npr. kemično odporen najlon), pri 0,45 µm.****4.5 Injekcijska brizga za enkratno uporabo, 5 ml.****4.6 Vakuumski ventil.****4.7 Ultrazvočna kopel.****5. Postopek****5.1 Splošno****5.1.1 Slepa krma**

Z analizo slepe krme se zagotovi, da niso prisotni niti diklazuril niti moteče snovi. Vrsta slepe krme je podobna vrsti vzorca in z analizo se dokaže odsotnost diklazurila ali motečih snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka se izvede tako, da se analizira slepa krma, ki se obogati s toliko diklaurila, kolikor ga je v vzorcu. Za koncentracijo 1 mg/kg se doda 0,1 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.8.1) v 50 g slepe krme, dobro se premeša in pusti 10 minut, pred nadaljevanjem (točka 5.2) pa se večkrat ponovno premeša.

Če pa vrsta slepe krme, podobna vrsti vzorca, ni na voljo (glej točko 5.1.1), se lahko preskus izkoristka izvede po metodi standardnega dodatka. V tem primeru se vzorcu za analizo doda količina diklaurila, podobna tisti v vzorcu. Ta vzorec se analizira skupaj z neobogatenim vzorcem, izkoristek pa se izračuna z odštevanjem.

5.2 Ekstrakcija

5.2.1 Krmne mešanice

Približno 50 g vzorca se natehta na 0,01 g natančno. Prenese se v 500-mililitrsko erlenmajerico, doda se 1,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.2) in 200 ml ekstrakcijskega topila (točka 3.12), nato pa se erlenmajerica zamaši. Mešanica se prek noči stresa v stresalniku (točka 4.1). Pusti se 10 minut, da se usede. 20-mililitrski alikvot supernatanta se prenese v primerno stekleno posodo in razredči z 20 ml vode (točka 3.1). Ta raztopina se prenese na ekstrakcijsko kartušo (točka 3.11), skozi jo pa se spusti z vakuumom (točka 4.6). Kartuša se spere s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (točka 3.12) in vode (točka 3.1), 65 + 35 (V + V). Zbrane frakcije se zavržejo, spojine pa se eluirajo s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (točka 3.12) in vode, 80 + 20 (V + V). Ta frakcija se upari v rotavaporju (točka 4.3) pri 60 °C do prve sušine. Ostanek se raztopi v 1,0 ml DMF (točka 3.6), doda se 1,5 ml vode (točka 3.1) in premeša. Filtrira se skozi membranski filter (točka 4.4), nameščen na injekcijsko brizgo za enkratno uporabo (točka 4.5). Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.2.2 Premiksi

Približno 1 g vzorca se natehta na 0,001 g natančno. Prenese se v 500-mililitrsko erlenmajerico, doda se 1,00 ml raztopine internega standarda (točka 3.9.3) in 200 ml ekstrakcijskega topila (točka 3.12), nato pa se erlenmajerica zamaši. Mešanica se prek noči stresa v stresalniku (točka 4.1). Pusti se 10 minut, da se usede. Alikvot (10 000/p ml, p = nominalna vsebnost diklaurila v mg/kg v premiksu) supernatanta se prenese v primerno veliko bučko z okroglim dnom. Do prve sušine se upari pri znižanem tlaku in 60 °C v rotavaporju (točka 4.3). Ostanek se ponovno raztopi v 10,0 ml DMF (točka 3.6), doda se 15,0 ml vode (točka 3.1) in premeša. Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.3 Določanje s HPLC

5.3.1 Parametri

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernica, lahko pa se uporabljajo drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne ali boljše rezultate:

- Kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, polnitev 3 µm ali enakovredna,
- Mobilna faza,
 - Eluent A (točka 3.13.1): vodna raztopina amonijevega acetata in tetrabutil amonijevega hidrogen sulfata,
 - Eluent B (točka 3.13.2): acetonitril,
 - Eluent C (točka 3.13.3): metanol,
- Način eluiranja – linearni gradient,
 - Začetni pogoji: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V),
 - po 10 minutah gradientno izpiranje v 30 minutah na: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V),
 - v 10 minutah se spere z B,
- Hitrost pretoka: 1,5–2 ml/min,

- Vbrizgani volumen: 20 µl,
- Valovna dolžina detektorja: 280 nm.

Stabilnost kromatografskega sistema se preveri z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umerjanje (točka 3.10.2) s koncentracijo 2 µg/ml diklaurila in internega standarda, dokler se ne dosežejo konstantne višine vrhov in konstantni retencijski časi.

5.3.2 Kromatografska analiza raztopin za umerjanje

Po dvakrat se vbrizga 20 µl raztopin za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5), identificirajo in integrirajo se interni standardni vrhovi, umeritvena krivulja pa se nariše na podlagi razmerja srednje vrednosti višine ali površine vrha diklaurila in srednje vrednosti višine ali površine vrha internega standardnega v primerjavi s koncentracijo diklaurila v raztopinah za umerjanje (µg/ml).

5.3.3 Kromatografska analiza vzorčnih raztopin

Dvakrat se vbrizga 20 µl vzorčne raztopine (točka 5.2.1 ali 5.2.2) ter določi srednja vrednost višine ali površine vrhov diklaurila in internega standarda.

6. Izračun rezultatov

6.1 Krmne mešanice

Vsebnost diklaurila (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{\frac{\text{višina}(d,s)}{\text{višina}(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ali } w = \frac{\frac{\text{površina}(d,s)}{\text{površina}(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

pri čemer je:

- višina(d,s) višina vrha diklaurila v vzorčni raztopini (točka 5.2.1)
- površina(d,s) površina vrha diklaurila v vzorčni raztopini (točka 5.2.1)
- višina(i,s) višina vrha internega standarda v vzorčni raztopini (točka 5.2.1)
- površina(i,s) površina vrha internega standarda v vzorčni raztopini (točka 5.2.1)
- b osni odsek umeritvene krivulje, izrisane iz raztopin za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5) v skladu s točko 5.3.2
- a naklon umeritvene krivulje, izrisane iz raztopin za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5) v skladu s točko 5.3.2
- m masa preskusnega deleža v gramih
- V končni volumen ekstrakta vzorca v mililitrih po ponovni raztopitvi v skladu s točko 5.2.1 (tj. 2,5 ml).

6.2 Premiksi

Vsebnost diklaurila (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{\frac{\text{višina}(d,s)}{\text{višina}(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ ali } w = \frac{\frac{\text{površina}(d,s)}{\text{površina}(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

pri čemer je:

- višina(d,s) višina vrha diklaurila v vzorčni raztopini (točka 5.2.2)
- površina(d,s) površina vrha diklaurila v vzorčni raztopini (točka 5.2.2)
- višina(i,s) višina vrha internega standarda v vzorčni raztopini (točka 5.2.2)
- površina(i,s) površina vrha internega standarda v vzorčni raztopini (točka 5.2.2)

- b osni odsek umeritvene krivulje, izrisane iz raztopin za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5) v skladu s točko 5.3.2
- a naklon umeritvene krivulje, izrisane iz raztopin za umerjanje (točke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 in 3.10.5) v skladu s točko 5.3.2
- m masa preskusnega deleža v gramih
- V končni volumen ekstrakta vzorca v mililitrih po ponovni raztopitvi v skladu s točko 5.2.2 (tj. 25 ml).
- p nominalna vsebnost diklazurila v mg/kg v premiksu.

7. Potrditev rezultatov

7.1 Identiteta

Identiteta analita se lahko potrdi z dodatno kromatografijo ali z detektorjem z diodnim nizom, s katerim se primerjata spekter ekstrakta vzorca (točka 5.2.1 ali 5.2.2) in spekter raztopine za umerjanje (točka 3.10.2).

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (točka 5.2.1 ali 5.2.2) se obogati s primerno količino raztopine za umerjanje (točka 3.10.2). Količina dodanega diklazurila mora biti podobna količini diklazurila v ekstraktu vzorca.

Povišana sta le vrh diklazurila in vrh internega standarda ob upoštevanju dodane količine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj $\pm 10\%$ prvotne širine vrha diklazurila ali internega standardnega vrha v vzorcu, ki mu diklazuril ni bil dodan.

7.1.2 Detekcija z diodnim nizom

Rezultati se ocenijo glede na naslednja merila:

- (a) valovni dolžini maksimalne absorpcije spektra vzorca in spektra standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, morata biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo z diodnim nizom je to običajno znotraj ± 2 nm;
- (b) med 230 nm in 320 nm se spekter vzorca in spekter standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, za navedene dele spektra ne smeta razlikovati v območju 10 %–100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje vrednosti in ko odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbanče standardnega analita;
- (c) med 230 nm in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, pridobljeni iz ekstrakta vzorca, za navedene dele spektra ne smejo razlikovati v območju 10 %–100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje točke in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbanče spektra najvišje točke vrha.

Če eno od teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh neodvisnih meritev na dveh podvzorcih ne sme presegati:

- 30 % višje vrednosti za vsebnosti diklazurila 0,5 mg/kg–2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg za vsebnosti diklazurila med 2,5 mg/kg in 5 mg/kg,
- 15 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti diklazurila nad 5 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Pri obogatenem (slepem) vzorcu je izkoristek najmanj 80 %.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirani sta bili dve medlaboratorijski študiji. V prvi študiji, ki jo je izvedla druga skupina laboratorijev leta 1994, so analizirani vzorci bili dva premiksa (O 100, A 100) in trije vzorci dopolnilnih krmnih mešanic za perutnino (L1, Z1, K1). En vzorec premiksa je bil mešan z organskim matriksom (O 100), drugi pa z anorganskim matriksom (A 100). Teoretična vsebnost je 100 mg diklazurila na kg. Laboratorijem je bilo naročeno, naj vsak vzorec analizirajo enkrat ali dvakrat. (Podrobnejše informacije o prvi medlaboratorijski študiji so v *Journal of AOAC International*, zvezek 77, št. 6, 1994, str. 1359–1361).

V drugi medlaboratorijski študiji so bile analizirane tri krmne mešanice za perutnino, ki vsebujejo diklazuril v koncentracijah 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) in slepo krmo (MAT 3). (Podrobne informacije o drugi študiji so v JRC Technical report (2016) in *Journal of AOAC International*, zvezek 102, št. 2, 2019, str. 646–652). Rezultati dveh medlaboratorijskih študij so navedeni v spodnji tabeli.

	Vzorec 1A 100	Vzorec 2O 100	Vzorec 3 L1	Vzorec 4 Z1	Vzorec 5 K1	Vzorec 6 MAT 1	Vzorec 7 MAT 2	Vzorec 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Srednja vrednost (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	—
Nominalna vsebnost (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Referenca (*)	Prva študija iz leta 1994	Prva študija iz leta 1994	Prva študija iz leta 1994	Prva študija iz leta 1994	Prva študija iz leta 1994	Druga študija iz leta 2015	Druga študija iz leta 2015	Druga študija iz leta 2015

L = število laboratorijev

n = število posameznih vrednosti

S_r = standardni odmik ponovljivosti

CV_r = koeficient variacije ponovljivosti

S_R = standardni odmik obnovljivosti

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti

LOQ = meja določljivosti

(*) Prva študija iz leta 1994: *Journal of AOAC International*, zvezek 77, št. 6, 1994, str. 1359–1361; Druga študija iz leta 2015: JRC Technical report „Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study“ (Ponovna potrditev metode za določanje diklazurila v okviru medlaboratorijske študije) (2016).

9. Splošne opombe

Predhodno je treba dokazati, da je odziv diklazurila linearen v območju koncentracij, ki se merijo.

Vsaj za analizo diklazurila v krmnih mešanicah z visoko vsebnostjo maščobe (za ta namen tiste mešanice, ki presegajo 12 % maščobe) se analizna metoda lahko nadomesti z drugo metodo na podlagi HPLC, npr. metoda na podlagi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z masno spektrometrijo (HPLC-MS), pod pogojem, da ima alternativna metoda enakovredne značilnosti učinkovitosti (stopnja izkoristka, natančnost pri ponovljivosti in pogoji obnovljivosti).

G. DOLOČANJE LASALOCID NATRIJA

Natrijeva sol polietra monokarboksilne kisline, proizvedene s *Streptomyces lasaliensis*

Vsebnost lasalocid natrija se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo spektrofлуorometričnega (fluorescenčnega) detektorja, kot je opisana v nadaljnjih točkah od 1 do 8.

1. **Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določanje ravni lasalocid natrija v krmi. Meja določanja je 5 mg/kg, meja določljivosti pa 10 mg/kg.

2. **Načelo**

Lasalocid natrij se ekstrahira iz vzorca v nakisani metanol in določi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo spektrofлуorometričnega (fluorescenčnega) detektorja.

3. **Reagenti**

3.1 Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4).

3.2 Ortofosforna kislina, m (m/m) = 85 %.

3.3 Raztopina ortofosforne kisline, c = 20 %
23,5 ml ortofosforne kisline (točka 3.2) se razredči s 100 ml vode.

3.4 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), m (m/m) = 99 %.

3.5 Metanol, za HPLC.

3.6 Klorovodikova kislina, gostota = 1,19 g/ml.

3.7 Fosfatna pufrna raztopina, c = 0,01 mol/l
1,36 g KH_2PO_4 (točka 3.1) se raztopi v 500 ml vode (točka 3.11), doda se 3,5 ml ortofosforne kisline (točka 3.2) in 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (točka 3.4). Vrednost pH se uravna na 4,0 z raztopino ortofosforne kisline (točka 3.3) in razredči na 1 000 ml z vodo (točka 3.11).

3.8 Nakisani metanol
5,0 ml klorovodikove kisline (točka 3.6) se prenese v 1 000-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z metanolom (točka 3.5) do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

3.9 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), raztopina fosfatnega pufra in metanola 5 + 95 (V + V)
5 ml raztopine fosfatnega pufra (točka 3.7) se zmeša s 95 ml metanola (točka 3.5).

3.10 Standardna snov lasalocid natrija, zajamčene čistosti, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natrijeva sol polietra monokarboksilne kisline, proizvedene s *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1 Osnovna standardna raztopina lasalocid natrija, 500 µg/ml
50 mg lasalocid natrija (točka 3.10) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopi se v nakisanem metanolu (točka 3.8) ter z istim topilom dopolni do oznake in premeša. To raztopino je treba pripraviti svežo pred uporabo.

3.10.2 Vmesna standardna raztopina lasalocid natrija, 50 µg/ml

10,0 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.10.1) se odpipetira v 100-mililitrsko merilno bučko, z nakisanim metanolom (točka 3.8) se dopolni do oznake in premeša. Ta raztopina se mora pripraviti sveža pred uporabo.

3.10.3 Raztopine za umerjanje

V serijo 50-mililitrskih merilnih bučk se prenese 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 in 10,0 ml vmesne standardne raztopine (točka 3.10.2). Z nakisanim metanolom se dopolni do oznake (točka 3.8) in premeša. Te raztopine ustrezajo 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 oz. 10,0 µg lasalocid natrija na ml. Te raztopine je treba pripraviti sveže pred uporabo.

3.11 Voda, za HPLC.

4. Naprava

4.1 Ultrazvočna kopel (ali stresalna vodna kopel) z nadzorom temperature.

4.2 Membranski filter, 0,45 µm.

4.3 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje volumnov 20 µl

4.3.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 125 mm × 4 mm C₁₈ z reverzno fazo, polnitev 5 µm ali enakovredna.

4.3.2 Spektrofluorometer s spremenljivo nastavitvijo valovnih dolžin ekscitacije in emisije.

5. Postopek

5.1 Splošno

5.1.1 Slepa krma

Za učinkovitost preskusa izkoristka (točka 5.1.2) se z analizo slepe krme zagotovi, da niso prisotni niti lasalocid natrij niti moteče snovi. Slepa krma je podobne vrste kot vzorec in dokaže se odsotnost lasalocid natrija ali motečih snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka se izvede z analiziranjem slepe krme, ki se obogati s količino lasalocid natrija, podobno tisti v vzorcu. Za obogatitev na ravni 100 mg/kg se 10,0 ml osnovnega standarda (točka 3.10.1) prenese v 250-mililitrsko erlenmajerico, raztopina pa se upari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slepe krme, dobro se premeša in pusti 10 minut, preden se nadaljuje s postopkom ekstrakcije (točka 5.2), pa se nekajkrat ponovno premeša.

Če pa vrsta slepe krme, podobna vrsti vzorca, ni na voljo (glej točko 5.1.1), se lahko preskus izkoristka izvede po metodi standardnega dodatka. V tem primeru se vzorec za analizo obogati s količino lasalocid natrija, podobno tisti v vzorcu. Ta vzorec se analizira skupaj z neobogatenim vzorcem, izkoristek pa se izračuna z odštevanjem.

5.2 Ekstrakcija

5.2.1 Krma

5 g–10 g vzorca se natehta na 0,01 g natančno in prenese v 250-mililitrsko erlenmajerico z zamaškom. S pipeto se doda 100,0 ml nakisanega metanola (točka 3.8). Zamašek se rahlo zapre, erlenmajerica pa se zavrti, da se delci razpršijo. Erlenmajerica se postavi v ultrazvočno kopel (točka 4.1) pri približno 40 °C za 20 minut, nato se odstrani iz kopeli in ohladi na sobno temperaturo. Pusti se stati približno 1 uro, dokler se suspenzija ne usede, nato pa se alikvot filtrira skozi 0,45 µm membranski filter (točka 4.2) v primerno posodo. Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.2.2 Premiksi

Približno 2 g nezmletega premiksa se natehta na 0,001 g natančno in prenese v 250-mililitrsko merilno bučko. Doda se 100,0 ml nakisanega metanola (točka 3.8) in bučka se zavrti, da se delci razpršijo. Erlenmajerica z vsebino se postavi v ultrazvočno kopel (točka 4.1) pri približno 40 °C za 20 minut, nato se odstrani iz kopeli in ohladi na sobno temperaturo. Z nakisanim metanolom (točka 3.8) se razredči do oznake in dobro premeša. Pusti se stati 1 uro, dokler se suspenzija ne obori, nato se alikvot filtrira skozi 0,45 µm membranski filter (točka 4.2). Primeren volumen čistega filtrata se razredči z nakisanim metanolom (točka 3.8), da nastane končna preskusna raztopina s koncentracijo približno 4 µg/ml lasalocid natrija. Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.3 Določanje s HPLC

5.3.1 Parametri

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernice; lahko se uporabljajo tudi drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate:

Kolona za tekočinsko kromatografijo 125 mm × 4 mm, z reverzno fazo C₁₈, polnitev 5 µm ali enakovredna (točka 4.3.1):

Mobilna faza (točka 3.9): Mešanica raztopine fosfatnega pufra (točka 3.7) in metanola (točka 3.5), 5 + 95 (V + V)

Hitrost pretoka: 1,2 ml/min

Detekcijska valovna dolžina: Ekscitacija: 310 nm

Emisija 419 nm

Vbrizgani volumen: 20 µl

Stabilnost kromatografskega sistema se preveri z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umerjanje (točka 3.10.3) s koncentracijo 4,0 µg/ml, dokler se ne dosežejo konstantne višine (ali površine) vrhov in konstantni retencijski časi.

5.3.2 Umeritvena krivulja

Vsaka raztopina za umerjanje (točka 3.10.3) se večkrat vbrizga in za vsako koncentracijo se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Umeritvena krivulja se pripravi tako, da se na ordinato nanesejo srednje vrednosti višin (površin) vrhov, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.3.3 Vzorčna raztopina

Večkrat se vbrizgajo ekstrakti vzorca, ki nastanejo pri točki 5.2.1 ali 5.2.2, pri čemer se uporabijo enaki volumni kot pri raztopinah za umerjanje ter določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov lasalocid natrija.

6. Izračun rezultatov

Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov, ki so nastali z vbrizganjem vzorčne raztopine (točka 5.3.3), se določi koncentracija lasalocid natrija (µg/ml) iz umeritvene krivulje.

6.1 Krma

Vsebnost lasalocid natrija (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemer je:

c = koncentracija lasalocid natrija v vzorčni raztopini (točka 5.2.1) v µg/ml

V₁ = volumen ekstrakta vzorca v skladu s točko 5.2.1 v ml (tj. 100)

m = masa preskusnega deleža v gramih

6.2 Premiksi

Vsebnost lasalocid natrija (w) (mg/kg) v vzorcu se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemer je:

- c = koncentracija lasalocid natrija v vzorčni raztopini (točka 5.2.2) v µg/ml
 V₂ = volumen ekstrakta vzorca v skladu s točko 5.2.2 v ml (tj. 250)
 f = faktor razredčitve v skladu s točko 5.2.2
 m = masa preskusnega deleža v gramih

7. Potrditev rezultatov

7.1 Identiteta

Metode, ki temeljijo na spektrofotometriji, so manj izpostavljene motnjam kot metode, pri katerih se uporablja UV-detekcija. Identiteta analita se lahko potrdi z dodatno kromatografijo.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca (točka 5.2.1 ali 5.2.2) se doda ustrezna količina raztopine za umerjanje (točka 3.10.3). Količina dodanega lasalocid natrija mora biti podobna količini lasalocid natrija v ekstraktu vzorca. Le vrh lasalocid natrija je povišan ob upoštevanju količine dodanega lasalocid natrija in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine vrha, ki nastane pri neobogatenem ekstraktu vzorca.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

- 15 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti lasalocid natrija od 30 mg/kg do 100 mg/kg;
- 15 mg/kg za vsebnosti lasalocid natrija od 100 mg/kg do 200 mg/kg;
- 7,5 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti lasalocid natrija več kot 200 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Za obogateni (slepi) vzorec krme je izkoristek najmanj 80 %. Za obogatene vzorce premiksov je izkoristek najmanj 90 %.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirana je bila medlaboratorijska študija (*), v kateri je 12 laboratorijev analiziralo 2 premiksa (vzorca 1 in 2) in 5 vzorcev krme (vzorci 3–7). Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat. Rezultati so navedeni v spodnji tabeli:

	Vzorec 1 Premiks za piščance	Vzorec 2 Premiks za purane	Vzorec 3 Briketi za purane	Vzorec 4 Drobtine za piščance	Vzorec 5 Krma za purane	Vzorec 6 Krma za perutnino A	Vzorec 7 Krma za perutnino B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vred- nost [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6

s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nominalna vsebnost [mg/kg]	5 000 (**)	16 000 (**)	80 (**)	105 (**)	120 (**)	50 (*)	35 (*)

L = število laboratorijev

n = število posameznih rezultatov

s_r = standardni odmik ponovljivosti

s_R = standardni odmik obnovljivosti

CV_r = koeficient variacije ponovljivosti, v %

CV_R = koeficient variacije obnovljivosti v %

(*) Analyst, 1995, 120, str. 2175–2180

(**) Vsebnost, ki jo navede proizvajalec

(*) Krma, pripravljena v laboratoriju

H. DOLOČANJE AMPROLIJEVEGA HIDROKLORIDA

1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinijev klorid monohidroklorid

1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje ravni amprolija v krmi. Meja zaznavnosti je 1 mg/kg, meja določljivosti pa 5 mg/kg.

2. Načelo

Vzorec se ekstrahira z mešanico metanola in vode. Po redčenju z mobilno fazo in membranski filtraciji se vsebnost amprolija določi s kationskoizmenjevalno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo UV-detektorja.

3. Reagenti

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, za HPLC.

3.3 Voda, za HPLC.

3.4 Raztopina natrijevega dihidrogen fosfata, $c = 0,1$ mol/l

V 1 000-mililitrski merilni bučki se v vodi (točka 3.3) raztopi 13,80 g natrijevega dihidrogen fosfat monohidrata, dopolni se z vodo (točka 3.3) do oznake in premeša.

3.5 Raztopina natrijevega perklorata, $c = 1,6$ mol/l

V 1 000-mililitrski merilni bučki se v vodi (točka 3.3) raztopi 224,74 g natrijevega perklorat monohidrata, dopolni se z vodo (točka 3.3) do oznake in premeša.

3.6 Mobilna faza za HPLC (glej točko 9.1)

Mešanica acetonitrila (točka 3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (točka 3.4) in raztopine natrijevega perklorata (točka 3.5), $450 + 450 + 100$ (v + v + v). Pred uporabo se filtrira z membranskim filtrom $0,22 \mu\text{m}$ (točka 4.3), raztopina pa se razplini (npr. najmanj 15 minut v ultrazvočni kopeli (točka 4.4)).

3.7 Standardna snov: čisti amprolij, 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinijev klorid, E 750 (glej točko 9.2)

3.7.1 Osnovna standardna raztopina amprolija, 500 µg/ml

50 mg amprolija (točka 3.7) se natehta na 0,1 mg natančno in prenese v 100-mililitrsko merilno bučko ter raztopi v 80 ml metanola (točka 3.1), bučka pa se za 10 minut postavi v ultrazvočno kopel (točka 4.4). Po ultrazvočni obdelavi se raztopina segreje na sobno temperaturo, dopolni se z vodo do oznake in premeša. Pri temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je raztopina stabilna en mesec.

3.7.2 Vmesna standardna raztopina amprolija, 50 µg/ml

5,0 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.7.1) se odpipetira v 50-mililitrsko merilno bučko, dopolni se z ekstrakcijskim topilom (točka 3.8) do oznake in premeša. Pri temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ je raztopina stabilna en mesec.

3.7.3 Raztopine za umerjanje

V serijo 50-mililitrskih merilnih bučk se prenese 0,5, 1,0, in 2,0 ml vmesne standardne raztopine (točka 3.7.2). Dopolni se z mobilno fazo (točka 3.6) do oznake in premeša. Te raztopine ustrezajo 0,5, 1,0 oz. 2,0 µg/ml amprolija. Te raztopine je treba pripraviti sveže pred uporabo.

3.8 Ekstrakcijsko topilo

Mešanica metanola (točka 3.1) in vode 2 + 1 (v + v).

4. Naprava

4.1 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje volumnov 100 µl

4.1.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 125 mm × 4 mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 5 µm ali 10 µm ali enakovredna

4.1.2 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino ali detektor z diodnim nizom

4.2 Membranski filter, material PTFE, 0,45 µm

4.3 Membranski filter, 0,22 µm

4.4 Ultrazvočna kopel

4.5 Mehanični stresalnik ali magnetno mešalo

5. Postopek

5.1 Splošno

5.1.1 Slepa krma

Za učinkovitost preskusa izkoristka (točka 5.1.2) se z analizo slepe krme zagotovi, da niso prisotni niti amprolij niti moteče snovi. Vrsta slepe krme je podobna vrsti vzorca in dokaže se odsotnost amprolija ali motečih snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka se izvede z analizo slepe krme, ki se obogati s količino amprolija, podobno tisti v vzorcu. Za obogatitev na ravni 100 mg/kg se 10,0 ml osnovne standardne raztopine (točka 3.7.1) prenese v 250-mililitrsko erlenmajerico, raztopina pa se upari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slepe krme, dobro se premeša in pusti 10 minut ter vmes nekajkrat ponovno premeša, nato pa se nadaljuje s postopkom ekstrakcije (točka 5.2).

Če pa vrsta slepe krme, podobna vrsti vzorca, ni na voljo (glej točko 5.1.1), se lahko preskus izkoristka izvede po metodi standardnega dodatka. V tem primeru se vzorec za analizo obogati s količino amprolija, podobno tisti v vzorcu. Ta vzorec se analizira skupaj z neobogatenim vzorcem, izkoristek pa se izračuna z odštevanjem.

5.2 Ekstrakcija

5.2.1 Premiksi (vsebnost amprolija < 1 %) in krma

V 500-mililitrsko erlenmajerico se natehta na 0,01 g natančno 5 g–40 g vzorca, odvisno od vsebnosti amprolija, in doda 200 ml ekstrakcijskega topila (točka 3.8). Erlenmajerica se postavi v ultrazvočno kopel (točka 4.4) in se pusti 15 minut. Odstrani se iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresa s stresalnikom ali meša z magnetnim mešalom (točka 4.5). Alikvot ekstrakta se razredči z mobilno fazo (točka 3.6), da nastane vsebnost amprolija 0,5–2 µg/ml, ter premeša (glej točko 9.3). 5 ml–10 ml tako razredčene raztopine se filtrira skozi membranski filter (točka 4.2). Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.2.2 Premiksi (vsebnost amprolija ≥ 1 %)

V 500-mililitrsko erlenmajerico se na 0,001 g natančno natehta 1 g–4 g premiksa, odvisno od vsebnosti amprolija, in doda 200 ml ekstrakcijskega topila (točka 3.8). Erlenmajerica se postavi v ultrazvočno kopel (točka 4.4) in se pusti 15 minut. Odstrani se iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresa s stresalnikom ali meša z magnetnim mešalom (točka 4.5). Alikvot ekstrakta se razredči z mobilno fazo (točka 3.6), da nastane vsebnost amprolija 0,5 µg/ml–2 µg/ml, ter premeša. 5 ml–10 ml tako razredčene raztopine se filtrira skozi membranski filter (točka 4.2). Nadaljuje se z določanjem s HPLC (točka 5.3).

5.3 Določanje s HPLC

5.3.1 Parametri:

Naslednji pogoji se lahko uporabljajo kot smernice, lahko pa se uporabljajo drugi pogoji, če zagotavljajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (točka 4.1.1):	125 mm × 4 mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 5 µm ali 10 µm ali enakovredna
Mobilna faza (točka 3.6):	Mešanica acetonitrila (točka 3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (točka 3.4) in raztopine natrijevega perklorata (točka 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).
Hitrost pretoka:	0,7–1 ml/min.
Detekcijska valovna dolžina:	264 nm
Vbrizgani volumen:	100 µl

Stabilnost kromatografskega sistema se preveri z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umerjanje (točka 3.7.3) s koncentracijo 1,0 µg/ml, dokler se ne dosežejo konstantne višine vrhov in konstantni retencijski časi.

5.3.2 Umeritvena krivulja

Za vsako koncentracijo se vsaka raztopina za umerjanje (točka 3.7.3) vbrizga večkrat, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Umeritvena krivulja se pripravi tako, da se na ordinato nanesejo srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

5.3.3 Vzorčna raztopina

Ekstrakt vzorca (točka 5.2) se večkrat vbrizga, pri čemer se uporabijo enaki volumni kakor pri raztopinah za umerjanje, nato pa se določijo srednje vrednosti višin (površin) vrhov amprolija.

6. Izračun rezultatov

Koncentracija vzorčne raztopine v µg/ml se določi iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov amprolija iz umeritvene krivulje (točka 5.3.2).

Vsebnost amprolija (w) v mg/kg vzorca se izračuna po naslednji formuli:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemer je:

- V = volumen ekstrakcijskega topila (točka 3.8) v ml v skladu s točko 5.2 (tj. 200 ml)
c = koncentracija amprolija v ekstraktu vzorca (točka 5.2) v µg/ml
f = faktor razredčitve v skladu s točko 5.2
m = masa preskusnega deleža v gramih

7. Potrditev rezultatov

7.1 Identiteta

Identiteta analita se lahko potrdi z dodatno kromatografijo ali z detektorjem z diodnim nizom, s katero se primerjata spekter ekstrakta vzorca (točka 5.2) in spekter raztopine za umerjanje (točka 3.7.3) s koncentracijo 2,0 µg/ml.

7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (točka 5.2) se obogati s primerno količino raztopine za umerjanje (točka 3.7.3). Količina dodanega amprolija mora biti podobna količini amprolija v ekstraktu vzorca.

Povišan je le vrh amprolija ob upoštevanju dodane količine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici maksimalne višine mora biti znotraj ± 10 % prvotne širine vrha, ki nastane pri ekstraktu vzorca brez dodanega amprolija.

7.1.2 Določanje z diodnim nizom

Rezultati se ocenijo glede na naslednja merila:

- valovni dolžini maksimalne absorpcije spektra vzorca in spektra standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, morata biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Pri določanju z diodnim nizom je to običajno ± 2 nm;
- med 210 nm in 320 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10 %–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje vrednosti in ko odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;
- med 210 nm in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, pridobljeni iz ekstrakta vzorca, za navedene dela spektra ne smejo razlikovati v območju 10 %–100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne iste najvišje točke in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Če eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

- 15 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti amprolija med 25 mg/kg in 500 mg/kg;
- 75 mg/kg za vsebnosti amprolija med 500 mg/kg in 1 000 mg/kg;
- 7,5 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti amprolija nad 1 000 mg/kg.

7.3 Izkoristek

Pri obogatenem (slepem) vzorcu je izkoristek najmanj 90 %.

8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirana je bila medlaboratorijska študija, pri kateri so bili analizirani trije vzorci perutninske krme (vzorci 1–3), en vzorec mineralne krme (vzorec 4) in en vzorec premiksa (vzorec 5). Rezultati so navedeni v spodnji tabeli:

	vzorec 1 (slepa krma)	vzorec 2	vzorec 3	vzorec 4	vzorec 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
srednja vrednost [mg/kg]	–	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	–	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	–	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	–	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	–	6,47	6,27	5,19	3,00
nominalna vsebnost [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

L: število laboratorijev
 n: število posameznih vrednosti
 s_r: standardni odmik ponovljivosti
 CV_r: koeficient variacije ponovljivosti
 s_R : standardni odmik obnovljivosti
 CV_R : koeficient variacije obnovljivosti

9. Opombe

- 9.1 Če vzorec vsebuje tiamin, se vrh tiamina v kromatogramu pojavi malo pred vrhom amprolija. Pri tej metodi se morata amprolij in tiamin ločiti. Če se amprolij in tiamin ne ločita s kolono (točka 4.1.1), ki se uporablja pri tej metodi, se do 50 % acetonitrila v mobilni fazi (točka 3.6) zamenja z metanolom.
- 9.2 Po britanski farmakopeji sta najvišji točki spektra raztopine amprolija ($c = 0,02$ mol/l) v klorovodikovi kislini ($c = 0,1$ mol/l) pri 246 nm in 262 nm. Absorbanca znaša 0,84 pri 246 nm in 0,80 pri 262 nm.
- 9.3 Ekstrakt se mora vedno razredčiti z mobilno fazo, ker se sicer retencijski čas vrha amprolija bistveno premakne zaradi sprememb v ionski moči.

I. DOLOČANJE NARAZINA

Vsebnost narazina se določi z naslednjim:

- analizo metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- metodo, opredeljeno s standardom EN ISO 14183 Krma – Določevanje monezina, narazina in salinomicina – Metoda tekočinske kromatografije s postkolonsko derivatizacijo.

J. DOLOČANJE NIKARBAZINA

Vsebnost nikarbazina se določi z naslednjim:

- analizo metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali

- metodo, opredeljeno s standardom EN 15782 Krma – Določevanje nikarbazina – Metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

K. DOLOČANJE DEKOKVINATA

Vsebnost dekokvinata se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidiostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- metodo, opredeljeno s standardom EN 16162 Krma – Določevanje dekokvinata s HPLC s fluorescentno detekcijo.

L. DOLOČANJE MONENZINA

Vsebnost monenzina se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidiostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- metodo, opredeljeno s standardom EN ISO 14183 Krma – Določevanje monezina, narazina in salinomicina – Metoda tekočinske kromatografije s postkolonsko derivatizacijo.

M. DOLOČANJE SALINOMICINA

Vsebnost salinomicina se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidiostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- metodo, opredeljeno s standardom EN ISO 14183 Krma – Določevanje monezina, narazina in salinomicina – Metoda tekočinske kromatografije s postkolonsko derivatizacijo.

N. DOLOČANJE SEMDURAMICINA

Vsebnost semduramicina se določi z naslednjim:

- analizno metodo, opredeljeno s standardom EN 17299 Krma: metode vzorčenja in analize – Pregled in določevanje dovoljenih kokcidiostatikov v koncentracijah dodatkov in njihovih nosilcih v območju od 1 % do 3 % v krmnih mešanicah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – Tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS), ali
- metodo, opredeljeno s standardom EN ISO 16158 Krma – Določevanje semduramicina – Metoda tekočinske kromatografije z „razvejanim“ analitskim pristopom.

O. STANDARDI EN

Za uporabo člena 34(2)(a) Uredbe (EU) 2017/625 so pomembni naslednji standardi EN:

EN ISO 30024 Krma – Določevanje aktivnosti fitaz.

EN 17050 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje joda v krmi z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS).

EN 17550 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje karotenoidov v krmnih mešanicah in premiksah s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z uporabo ultravijolične (UV) detekcije (HPLC-UV).

EN 15784 Krma: Metode vzorčenja in analize – Določanje in štetje prisotnih *Bacillus* spp. uporabljen kot krmni dodatek.

EN 15785 Krma – Izolacija in štetje domnevno prisotnih *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Krma: metode vzorčenja in analize – Določanje in štetje prisotnih *Pediococcus* spp., uporabljenih kot krmni dodatek.

EN 15787 Krma: metode vzorčenja in analize – Določanje in štetje prisotnih *Lactobacillus* spp., uporabljenih kot krmni dodatek.

EN 15788 Krma: metode vzorčenja in analize – Določanje in štetje prisotnih *Enterococcus* (*E. faecium*) spp., uporabljenih kot krmni dodatek.

EN 15789 Krma: metode vzorčenja in analize – Določanje in štetje *Saccharomyces cerevisiae*, uporabljenih kot krmni dodatek.

EN 15510 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, železa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena in svinca z ICP-AES (za analizo krmnih dodatkov kobalta in molibdena).

EN 15621 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, žvepla, železa, cinka, bakra, mangana in kobalta po razklopu pod tlakom z ICP-AES (za analizo krmnega dodatka kobalta).

EN 16159 Krma – Določevanje selena s hidridno atomsko absorpcijsko spektrometrijo (HGAAS) po mikrovalovnem razklopu (razklop s 65 % dušikovo kislino in 30 % vodikovim peroksidom) (za analizo krmnega dodatka selena).

EN 17053: Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje elementov v sledovih, težkih kovin in drugih elementov v krmi z ICP-MS (večelementna metoda) (za analizo krmnih dodatkov kobalta, molibdena in selena).“.

PRILOGA V

„PRILOGA V

ANALIZNE METODE ZA NADZOR NEZAŽELENIH SNOVI V KRMI

A. DOLOČANJE VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN PCB

POGLAVJE I

METODE VZORČENJA IN RAZLAGA REZULTATOV ANALIZE

1. Področje uporabe in opredelitev pojmov

Vzorci za uradni nadzor vsebnosti polikloriranih dibenzo-p-dioksinov (PCDD), polikloriranih dibenzofuranov (PCDF), dioksinom podobnih polikloriranih bifenilov (PCB) ⁽¹⁾ in dioksinom nepodobnih PCB v krmi se odvzamejo v skladu z določbami iz Priloge I. Upoštevajo se količinske zahteve za nadzor snovi ali proizvodov, enakomerno porazdeljenih po krmi, kot je določeno v točki 5.1 Priloge I. Tako dobljeni zbirni vzorci se štejejo za reprezentativne vzorce lotov ali subplotov, iz katerih so vzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi, določenimi v Direktivi 2002/32/ES, se ugotavlja na podlagi vrednosti, ugotovljenih v laboratorijskih vzorcih.

V tem delu se uporabljajo opredelitve pojmov iz Priloge I k Izvedbeni uredbi Komisije 2021/808 ⁽²⁾.

Poleg navedenih opredelitev pojmov se v tem delu uporabljata tudi naslednji opredelitvi pojmov:

- ⁽¹⁾ Tabela TEF (= faktorjev toksične ekvivalentnosti) za PCDD, PCDF in dioksinom podobne PCB: Faktorji toksične ekvivalentnosti (TEF) Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) za oceno tveganja za ljudi, ki temeljijo na sklepih Svetovne zdravstvene organizacije – strokovnega srečanja Mednarodnega programa za kemijsko varnost (IPCS) junija 2005 v Ženevi (Martin van den Berg in drugi, Ponovna ocena faktorjev toksične ekvivalentnosti za dioksine in dioksinom podobne spojine pri ljudeh in sesalcih, Svetovna zdravstvena organizacija, 2005 (The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds). Toxicological Sciences 93(2), str. 223–241 (2006)).

Kongener	Vrednost TEF	Kongener	Vrednost TEF
Dibenzo-p-dioksini („PCDD“) in dibenzo-p-furani („PCDF“)		„Dioksinom podobni“ PCB: neorto PCB + monoorto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Neorto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Monoorto PCB	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 118	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 123	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 167	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Uporabljene okrajšave: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = heksa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = klorodibenzodioksin; „CDF“ = klorodibenzofuran; „CB“ = klorobifenil.

- ⁽²⁾ Izvedbena uredba Komisije (EU) 2021/808 z dne 22. marca 2021 o izvajanju analizičnih metod za ostanke farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo pri živalih za proizvodnjo živil, o razlagi rezultatov in metodah, ki jih je treba uporabljati za vzorčenje, ter o razveljavitvi odločb 2002/657/ES in 98/179/ES (UL L 180, 21.5.2021, str. 84).

„Presejalne metode“ pomenijo metode za izbiro tistih vzorcev, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presegajo mejne vrednosti ali pragove ukrepanja. Omogočajo stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečujejo možnosti za odkrivanje novih primerov velike izpostavljenosti in tveganja za zdravje potrošnikov. Presejalne metode temeljijo na bioanaliznih metodah ali metodah GC-MS. Rezultati vzorcev, ki presegajo izločitveno vrednost za preverjanje skladnosti z mejno vrednostjo, se preverijo s popolno ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno metodo.

„Potrditvene metode“ pomenijo metode, ki zagotavljajo celovite ali dopolnilne informacije za natančno opredelitev in količinsko določitev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB pri mejni vrednosti ali po potrebi pri pragu ukrepanja. Pri takih metodah se uporablja plinska kromatografija/masna spektrometrija visoke ločljivosti (GC-HRMS) ali plinska kromatografija/tandemska masna spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Skladnost lotov ali subplotov z mejno vrednostjo

2.1. Glede dioksinom nepodobnih PCB

Lot ali subplot je v skladu z mejno vrednostjo, če rezultat analize za vsoto PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 in PCB 180 (v nadaljnjem besedilu: dioksinom nepodobni PCB) ne presega mejne vrednosti iz Direktive 2002/32/ES, ob upoštevanju merilne negotovosti ⁽³⁾. Lot ali subplot ni v skladu z mejno vrednostjo iz Direktive 2002/32/ES, če povprečje dveh rezultatov analiz na zgornji meji ⁽⁴⁾, pridobljenih z dvakratno analizo ⁽⁵⁾, ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti nedvomno presega mejno vrednost, tj. za oceno skladnosti se uporabi analizirana koncentracija po odbitku razširjene merilne negotovosti.

Razširjena merilna negotovost se izračuna z uporabo faktorja zajetja 2, ki pomeni stopnjo zaupanja približno 95 %. Lot ali subplot je neskladen, če je povprečje izmerjenih vrednosti, od katerega se odšteje razširjena merilna negotovost povprečne vrednosti, nad mejno vrednostjo.

Pravila, navedena v zgornjih odstavkih te točke, se uporabljajo za analizni rezultat vzorcev za uradni nadzor. Pri analizi za drugo strokovno mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

2.2. Glede PCDD/F in dioksinom podobnih PCB

Lot ali subplot je v skladu z mejno vrednostjo, če rezultat posamezne analize:

- opravljene s presejalno metodo, pri kateri je delež lažno skladnih rezultatov manjši od 5 %, pokaže, da vsebnost ne presega zadevne mejne vrednosti PCDD/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES,
- opravljene s potrditveno metodo, ne presega zadevne mejne vrednosti PCDD/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB iz Direktive 2002/32/ES, ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti.

⁽³⁾ Kadar je primerno, se upoštevajo načela, opisana v smernicah o merilni negotovosti za laboratorije, ki opravljajo analize vsebnosti PCDD/F in PCB z uporabo izotopske razredčitve – masne spektrometrije (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf).

⁽⁴⁾ Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, uporablja vrednost meje določljivosti. Pojem „na spodnji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, uporablja vrednost nič. Pojem „na srednji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, uporablja polovična vrednost meje določljivosti.

⁽⁵⁾ Dvakratna analiza: ločena analiza predpisanih analitov z uporabo drugega alikvota istega homogeniziranega vzorca. Na splošno se uporabljajo zahteve za dvakratno analizo iz Priloge II, poglavje C, točka 3. Vendar je za metode, pri katerih se za ustrezne analite uporablja s ¹³C označen interni standard, dvakratna analiza potrebna le, če rezultat prvega določanja ni skladen. Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti internega navzkrižnega onesnaženja ali naključne zamenjave vzorcev. Kadar se analiza izvaja zaradi onesnaženja, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani z onesnaženjem, ugotovljena vsebnost pa bistveno presega mejno vrednost.

Za presejalne preskuse se določi izločitvena vrednost za odločitve o skladnosti vzorcev z zadevnimi mejnimi vrednostmi, določenimi za PCDD/F ali za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.

Lot ali subplot ni v skladu z mejno vrednostjo iz Direktive 2002/32/ES, če povprečje dveh rezultatov analiz na zgornji meji ⁽⁶⁾, pridobljenih z dvakratno analizo ⁽⁷⁾, z uporabo potrditvene metode, ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti nedvomno presega mejno vrednost, tj. za oceno skladnosti se uporabi analizirana koncentracija po odbitku razširjene merilne negotovosti.

Razširjena merilna negotovost se izračuna z uporabo faktorja zajetja 2, ki pomeni stopnjo zaupanja približno 95 %. Lot ali subplot je neskladen, če je povprečje izmerjenih vrednosti, od katerega se odšteje razširjena merilna negotovost povprečne vrednosti, nad mejno vrednostjo.

Vsota ocenjene razširjene merilne negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB se uporabi za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.

Pravila, navedena v zgornjih odstavkih te točke, se uporabljajo za analizi rezultat vzorcev za uradni nadzor. Pri analizi za dopolnilno izvedensko mnenje ali referenčne namene se uporabljajo nacionalna pravila.

3. REZULTATI, KI PRESEGAJO PRAGOVE UKREPANJA IZ PRILOGE II K DIREKTIVI 2002/32/ES

Pragovi ukrepanja so orodje za izbiro vzorcev v tistih primerih, ko je treba določiti vir onesnaženja in sprejeti ukrepe za njegovo zmanjšanje ali odpravo. S presejalnimi metodami se določijo ustrezne izločitvene vrednosti za izbiro navedenih vzorcev. Če so za določitev vira in zmanjšanje ali odpravo onesnaženja potrebna precejšnja prizadevanja, je primerno, da se preseganje praga ukrepanja potrdi z dvakratno analizo s potrditveno metodo ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti ⁽⁸⁾.

POGLAVJE II

PRIPRAVA VZORCA IN ZAHTEVE ZA ANALIZNE METODE ZA URADNI NADZOR VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/F) IN DIOKSINOM PODOBNIH PCB V KRMI

1. Področje uporabe

Zahteve, določene v tem poglavju, se uporabijo, kadar se krma analizira za uradni nadzor vsebnosti 2,3,7,8-substituiranih PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, ter za pripravo vzorcev in analize zahteve za druge regulativne namene, kar vključuje nadzor, ki ga izvajajo nosilci dejavnosti poslovanja s krmo za zagotovitev skladnosti z določbami Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 183/2005 ⁽⁹⁾.

Prisotnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v krmi se lahko spremlja z dvema različnima vrstama analiznih metod:

⁽⁶⁾ Pojem „na zgornji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, k toksičnemu ekvivalentu (TEQ) uporablja vrednost meje določljivosti. Pojem „na spodnji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, k TEQ uporablja vrednost nič. Pojem „na srednji meji“ zahteva, da se za izračun prispevka vsakega kongenerja, ki ni količinsko določen, k TEQ uporablja polovična vrednost meje določljivosti.

⁽⁷⁾ Na splošno se uporabljajo zahteve za dvakratno analizo iz Priloge II, poglavje C, točka 3. Vendar je za potrditvene metode, pri katerih se za ustrezne analite uporablja s ¹³C označen interni standard, dvakratna analiza potrebna le, če rezultat prvega določanja ni skladen. Dvakratna analiza je potrebna za izključitev možnosti internega navzkrižnega onesnaženja ali naključne zamenjave vzorcev. Kadar se analiza izvaja zaradi onesnaženja, se lahko izpusti potrjevanje z dvakratno analizo, če so vzorci, izbrani za analizo, s sledljivostjo povezani z onesnaženjem, ugotovljena vsebnost pa bistveno presega mejno vrednost.

⁽⁸⁾ Enaka razlaga in zahteve za dvakratno analizo za nadzor pragov ukrepanja kot v opombi 5 za mejne vrednosti.

⁽⁹⁾ Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 183/2005 z dne 12. januarja 2005 o zahtevah glede higiene krme (UL L 35, 8.2.2005, str. 1).

(a) *Presejalne metode*

Cilj presejalnih metod je izbor tistih vzorcev, katerih vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB presegajo mejne vrednosti ali pragove ukrepanja. Presejalne metode zagotavljajo stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečujejo možnosti za odkrivanje novih primerov, ko velika izpostavljenost lahko privede do tveganja za zdravje potrošnikov. Z njihovo uporabo naj bi se izognili lažno skladnim rezultatom. Vključujejo lahko bioanalizne metode in metode GC-MS.

Presejalne metode temeljijo na primerjavi rezultata analize z izločitveno vrednostjo in omogočajo odločitev „da/ne“ glede morebitnega preseganja mejne vrednosti ali praga ukrepanja. Koncentracija PCDD/F ter vsota PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih, za katere se domneva, da niso v skladu z mejno vrednostjo, se določita/potrdira s potrditveno metodo.

Poleg tega lahko presejalne metode nakažejo vsebnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcu. V primeru uporabe bioanaliznih presejalnih metod se rezultat izrazi v bioanaliznih ekvivalentih (BEQ), v primeru uporabe fizikalno-kemijskih metod GC-MS pa v toksičnih ekvivalentih (TEQ). Številčno navedeni rezultati presejalnih metod so primerni za dokazovanje skladnosti ali domnevne neskladnosti ali preseganja pragov ukrepanja ter nakažejo območje vrednosti v primeru spremljanja s potrditvenimi metodami. Presejalne metode pa niso primerne za namene, kot so ocena ravni prisotnosti, ocena vnosa, spremljanje časovnih gibanj vrednosti ali ponovna ocena pragov ukrepanja in mejnih vrednosti.

(b) *Potrditvene metode*

Potrditvene metode omogočajo nedvoumno identifikacijo in količinsko določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, prisotnih v vzorcu, ter zagotavljajo celovite informacije na ravni posameznih kongenerjev. Zato te metode omogočajo nadzor mejnih vrednosti in pragov ukrepanja, vključno s potrditvijo rezultatov, pridobljenih s presejalnimi metodami. Poleg tega se rezultati lahko uporabljajo za druge namene, na primer za določitev nizkih ravni prisotnosti pri nadzoru krme, spremljanje časovnih gibanj, oceno izpostavljenosti ter vzpostavljane zbirke podatkov za morebitno ponovno oceno pragov ukrepanja in mejnih vrednosti. Te metode so pomembne tudi za določitev vzorcev pojavljanja kongenerjev za ugotovitev vira morebitnega onesnaženja. Pri takih metodah se uporablja GC-HRMS. Za potrditev skladnosti ali neskladnosti z mejno vrednostjo se lahko uporabi tudi GC-MS/MS.

2. Ozadje

Za izračun koncentracij TEQ se koncentracije posameznih snovi v danem vzorcu pomnožijo z njihovim ustreznim faktorjem toksične ekvivalentnosti (TEF) (glej opombo 1 v poglavju I) ter se nato seštejejo, da se dobi skupna koncentracija dioksinom podobnih spojin, izraženih v TEQ.

V tem delu A sprejemljiva specifična meja določljivosti posameznega kongenerja pomeni najmanjšo vsebnost analita, ki se lahko izmeri s sprejemljivo statistično gotovostjo, poleg tega pa morajo biti izpolnjeni tudi pogoji za določitev, kot so opisani v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (Krma – Določevanje dioksinov in dioksinu podobnih PCB z GC/HRMS in indikatorjev PCB z GC/HRMS), in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani.

Meja določljivosti posameznega kongenerja se lahko opredeli kot:

- (a) koncentracija analita v ekstraktu vzorca, ki ustvari instrumentalni odziv pri sledenju dveh različnih ionov, ki ju je treba spremljati z razmerjem signal/šum 3:1 pri manj občutljivem signalu neobdelanih podatkov, ali
- (b) točka najnižje koncentracije na umeritveni krivulji, ki zagotavlja sprejemljivo ($\leq 30\%$) in stalno (merjeno najmanj na začetku in koncu analiznega niza vzorcev) odstopanje od povprečnega relativnega faktorja odziva, izračunanega za vse točke na umeritveni krivulji v vsakem nizu vzorcev, če zaradi tehničnih razlogov izračun signal/šum ne zagotovi zanesljivih rezultatov. Meja določljivosti (LOQ) se izračuna iz točke najnižje koncentracije ob upoštevanju izkoristka internih standardov in količine vzorca.

Bioanalizne presejalne metode ne dajejo rezultatov na ravni kongenerjev, temveč zgolj nakažejo ⁽¹⁰⁾ vrednosti TEQ, izražene v BEQ, saj vse spojine, ki so prisotne v ekstraktu vzorca in pokažejo odziv pri preskusu, morda ne izpolnjujejo vseh zahtev načela TEQ.

Presejalne in potrditvene metode se lahko uporabijo za nadzor določenega matriksa le, če so metode dovolj občutljive, da se z njimi zanesljivo odkrijejo vsebnosti pri mejni vrednosti ali pragu ukrepanja.

3. **Zahteve za zagotavljanje kakovosti**

- 3.1 Sprejmejo se ukrepi za preprečitev navzkrižnega onesnaženja na vseh stopnjah vzorčenja in analiznega postopka.
- 3.2 Vzorci se hranijo in prevažajo v steklenih, aluminijastih, polipropilenskih ali polietilenskih posodah, ki so primerne za shranjevanje brez vplivanja na vsebnost PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v vzorcih. Iz posode za vzorce se odstranijo sledovi papirnega prahu.
- 3.3 Vzorci se hranijo in prevažajo tako, da se ohrani neoporečnost vzorca krme.
- 3.4 Če je ustrezno, se vsak laboratorijski vzorec drobno zmelje in temeljito premeša po postopku, s katerim se dokazano doseže popolna homogenizacija (npr. zmleto tako, da se preseje z 1-milimetrskim sitom). Če je vsebnost vlage previsoka, se vzorci pred mletjem posušijo.
- 3.5 Reagenti, steklovina in oprema se nadzorujejo zaradi mogočega vpliva na rezultate, izražene v TEQ ali BEQ.
- 3.6 Slepa analiza se opravi z izvedbo celotnega analiznega postopka, iz katerega se izpusti le vzorec.
- 3.7 Pri bioanaliznih metodah se preskušajo steklovina in topila, ki se uporabljajo za analizo, da ne vsebujejo spojin, ki vplivajo na ugotavljanje ciljnih spojin v delovnem območju. Steklovina se spere s topli ali segreje do temperatur, primernih za odstranitev sledov PCDD/F, dioksinom podobnih spojin in motečih spojin z njene površine.
- 3.8 Količina vzorca, uporabljenega za ekstrakcijo, zadostuje za izpolnjevanje zahtev glede dovolj nizkega delovnega območja, vključno s koncentracijami mejnih vrednosti ali praga ukrepanja.
- 3.9 Posebni postopki za pripravo vzorca, ki se uporabljajo za obravnavane proizvode, so skladni z mednarodno sprejetimi smernicami, tj. EN ISO 6498.

4. **Zahteve za laboratorije**

- 4.1 V skladu z določbami Uredbe (EU) 2017/625 laboratorije akreditirajo priznani organi, ki delujejo v skladu z zahtevami vodnika ISO/IEC 58, s čimer je zagotovljeno, da izvajajo analizo zagotavljanje kakovosti. Laboratoriji se akreditirajo po standardu EN ISO/IEC 17025. Upoštevajo se načela, kot so opisana v tehničnih smernicah za oceno merilne negotovosti in mej določljivosti za analizo vsebnosti PCDD/F in PCB ⁽¹¹⁾.
- 4.2 Usposobljenost laboratorijev se dokazuje z nenehnim uspešnim sodelovanjem v medlaboratorijskih študijah za določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v ustreznih matriksih krme in območjih koncentracij.

⁽¹⁰⁾ Bioanalizne metode niso specifične za tiste kongenerje, ki so vključeni v shemo TEF. V ekstraktu vzorca so lahko prisotne druge strukturno povezane spojine, ki se vežejo na aromatski ogljikovodikov receptor (AhR), kar prispeva k celotnemu odzivu. Bioanalizni rezultati zato ne morejo dati ocene vrednosti, temveč le nakažejo vrednost TEQ v vzorcu.

⁽¹¹⁾ Smernice o merilni negotovosti za laboratorije, ki opravljajo analize vsebnosti PCDD/F in PCB z uporabo izotopske razredčitve – masne spektrometrije (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), smernice za ocenjevanje meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za meritve na področju onesnaževal v krmi in živilih (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

- 4.3 Laboratoriji, ki izvajajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo, da se zagotovi nadzor kakovosti in potrdi rezultat analize sumljivih vzorcev.

5. **Osnovne zahteve za analizne postopke za dioksine (PCDD/F) in dioksinom podobne PCB**

5.1 *Nizko delovno območje in meje določljivosti*

Za PCDD/F so zaradi izredne toksičnosti nekaterih od teh spojin zaznavne količine v zgornjem femtogramskem območju (10^{-15} g). Za večino kongenerjev PCB je meja določljivosti v nanogramskem območju (10^{-9} g) že zadostna. Za merjenje bolj toksičnih dioksinom podobnih kongenerjev PCB (zlasti neorto substituiranih kongenerjev) spodnji del delovnega območja dosega spodnje pikogramsko območje (10^{-12} g). Za vse druge kongenerje PCB zadostuje meja določljivosti v nanogramskem območju (10^{-9} g).

5.2 *Velika selektivnost (specifičnost)*

- 5.2.1 Ločevati je treba med PCDD/F in dioksinom podobnimi PCB ter številnimi drugimi spojinami, ki se ekstrahirajo hkrati in so morda moteče ter so prisotne v koncentracijah, ki so do več velikostnih razredov višje od koncentracij predpisanih analitov. Za metode GC-MS je treba ločevati med različnimi kongenerji, na primer med toksičnimi (npr. sedemnajst 2,3,7,8-substituiranih PCDD/F in dvanajst dioksinom podobnih PCB) in drugimi kongenerji.

- 5.2.2 Bioanalizne metode omogočajo ugotavljanje ciljnih spojin kot vsote PCDD/F in/ali dioksinom podobnih PCB. Vzorec se očisti, da se odstranijo spojine, ki povzročajo lažno neskladne rezultate, ali spojine, ki lahko zmanjšajo odziv in povzročijo lažno skladne rezultate.

5.3 *Velika točnost (pravilnost in natančnost, navidezni izkoristek pri bioloških preskusih)*

- 5.3.1 Pri metodah GC-MS določanje zagotovi veljavno oceno pravih koncentracij v vzorcu. Zahteva se velika točnost, da se prepreči zavrnitev rezultata analize vzorca zaradi slabe zanesljivosti ugotovljene vrednosti TEQ. Točnost se izrazi kot *pravilnost* (razlika med izmerjeno povprečno vrednostjo analita v certificiranem materialu in njegovo certificirano vrednostjo, izražena kot delež te vrednosti) in *natčnost* (relativni standardni odklon (RSD_R), izračunan iz rezultatov, pridobljenih pri pogojih obnovljivosti).

- 5.3.2 Pri bioanaliznih metodah se določi navidezni izkoristek pri bioloških preskusih. Navidezni izkoristek pri bioloških preskusih pomeni vrednost BEQ, izračunano iz umeritvene krivulje na podlagi TCDD ali PCB 126, po popravku za slepo vrednost, ki se nato deli z vrednostjo TEQ, določeno s potrditveno metodo. Njegov namen je popraviti vplive, kot so izguba PCDD/F in dioksinom podobnih spojin med postopki ekstrakcije in čiščenja, soekstrahirane spojine, ki povečujejo ali zmanjšujejo odziv (agonistični in antagonistični učinki), kakovost prilagajanja krivulje ali razlike med vrednostmi faktorja toksične ekvivalentnosti (TEF) in relativne učinkovitosti (REP). Navidezni izkoristek pri bioloških preskusih se izračuna iz ustreznih referenčnih vzorcev, ki imajo reprezentativno porazdelitev kongenerjev v območju predpisane vrednosti.

5.4 *Validacija v območju mejne vrednosti in splošni ukrepi za nadzor kakovosti*

- 5.4.1 Laboratoriji dokažejo učinkovitost metode v območju mejne vrednosti, npr. 0,5-kratna, 1-kratna in 2-kratna mejna vrednost s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize, med postopkom validacije in rutinsko analizo.

- 5.4.2 Redne slepe kontrole in cepljeni preskusi ali analize kontrolnih vzorcev (če je na voljo, je zaželen certificiran referenčni material) se izvajajo kot notranji nadzorni ukrepi za zagotavljanje kakovosti. Za slepe kontrole, cepljene preskuse ali analize kontrolnih vzorcev se vodijo in preverjajo karte za nadzor kakovosti, s čimer se zagotovi, da je analizna učinkovitost v skladu z zahtevami.

5.5 Meja določljivosti

5.5.1 Za bioanalizno presejalno metodo določitev meje določljivosti (LOQ) ni nujna zahteva, vendar je treba dokazati, da lahko metoda razlikuje med slepo vrednostjo in izločitveno vrednostjo. Pri določanju vrednosti BEQ se določi prag poročanja zaradi obravnave vzorcev, pri katerih je odziv pod tem pragom. Za prag poročanja je treba dokazati, da se najmanj za trikrat razlikuje od postopka s slepimi vzorci, pri katerih je odziv pod delovnim območjem. Zato se izračuna iz vzorcev, ki vsebujejo ciljne spojine blizu zahtevane najnižje vrednosti, ne pa iz razmerja med signalom in šumom ali slepega preskusa.

5.5.2 LOQ za potrditveno metodo je približno ena petina mejne vrednosti.

5.6 Merila za analizo

Za zanesljive rezultate potrditvenih ali presejalnih metod so izpolnjena naslednja merila v območju mejne vrednosti glede vrednosti TEQ oziroma vrednosti BEQ, ki je določena kot skupna vrednost TEQ ali skupna vrednost BEQ (kot vsota PCDD/F in dioksinom podobnih PCB) ali posebej za PCDD/F in dioksinom podobne PCB.

	Presejanje z bioanaliznimi ali fizikalno-kemijskimi metodami	Potrditvene metode
Delež lažno skladnih rezultatov (*)	< 5 %	
Pravilnost		– 20 % do + 20 %
Ponovljivost (RSD _r)	< 20 %	
Vmesna natančnost (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Glede na mejne vrednosti.

5.7 Posebne zahteve za presejalne metode

5.7.1 Pri presejanju se lahko uporabijo metode GC-MS in bioanalizne metode. Metode GC-MS izpolnjujejo zahteve iz točke 6. Za bioanalizne metode na celični osnovi so posebne zahteve določene v točki 7.

5.7.2 Laboratoriji, ki uporabljajo presejalne metode za rutinski nadzor vzorcev, vzpostavijo tesno sodelovanje z laboratoriji, ki izvajajo potrditveno metodo.

5.7.3 Med rutinsko analizo je treba opraviti preverjanje učinkovitosti presejalne metode z analiznim nadzorom kakovosti in nenehno validacijo metod. Nenehno se izvaja program nadzora nad skladnimi rezultati.

5.7.4 Preverjanje mogočega zmanjšanja celične odzivnosti in citotoksičnosti:

20 % ekstraktov vzorcev se izmeri med rutinskim presejanjem brez 2,3,7,8-TCDD in z dodanim 2,3,7,8-TCDD, ki ustreza mejni vrednosti ali pragu ukrepanja, da se preveri, ali je morda odziv zmanjšan zaradi motečih snovi v ekstraktu vzorca. Izmerjena koncentracija cepljenega vzorca se primerja z vsoto koncentracije necepljenega ekstrakta in cepljene koncentracije. Če je ta izmerjena koncentracija za več kot 25 % nižja od izračunane (vsote) koncentracije, to kaže na mogoče zmanjšanje signala, zato se za zadevni vzorec opravi potrditvena analiza GC-HRMS. Rezultati se spremljajo v kartah za nadzor kakovosti.

5.7.5 Nadzor kakovosti skladnih vzorcev:

Približno od 2 % do 10 % skladnih vzorcev, odvisno od matriksa vzorca in laboratorijskih izkušenj, se potrdi z GC-HRMS.

5.7.6 Določanje deleža lažno skladnih rezultatov na podlagi podatkov nadzora kakovosti:

Določi se delež lažno skladnih rezultatov pri presejanju vzorcev pod mejno vrednostjo ali pragom ukrepanja in nad njima. Dejanski delež lažno skladnih rezultatov je manjši od 5 %. Ko je pri nadzoru kakovosti skladnih vzorcev na voljo najmanj 20 potrjenih rezultatov na matriks/skupino matrikov, se na podlagi te zbirke podatkov pripravijo ugotovitve o deležu lažno skladnih rezultatov. Rezultati vzorcev, analiziranih s krožnimi preskusi ali med pojavi onesnaženja, ki zajemajo območje koncentracije do npr. dvakratne mejne vrednosti, so prav tako lahko vključeni v kvoto najmanj 20 rezultatov za oceno deleža lažno skladnih rezultatov. Vzorci zajemajo najpogostejše vzorce pojavljanja kongenerjev, ki predstavljajo različne vire.

Čeprav je glavni namen presejalnih preskusov odkrivanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, je merilo za določanje deleža lažno skladnih rezultatov mejna vrednost, ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti potrditvene metode.

5.7.7 Morebitni neskladni vzorci pri presejanju se vedno preverijo s celovito ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno analizo metodo. Ti vzorci se lahko uporabijo tudi za oceno deleža lažno neskladnih rezultatov. Pri presejalnih metodah je delež lažno neskladnih rezultatov delež rezultatov, za katere je s potrditveno analizo potrjeno, da so skladni, čeprav je bilo pri predhodnem presejanju ugotovljeno, da je vzorec morda neskladen. Ocena koristnosti presejalne metode temelji na primerjavi lažno neskladnih vzorcev in celotnega števila pregledanih vzorcev. Ta delež je dovolj majhen, da upraviči uporabo presejalnega orodja.

5.7.8 Bioanalizne metode pri pogojih validacije veljavno nakažejo vrednost TEQ, ki je izračunana in izražena kot BEQ.

Tudi pri bioanaliznih metodah pri ponovljenih pogojih je interni laboratorijski RSD_r običajno manjši kot pri pogojih obnovljivosti (RSD_R).

6. Posebne zahteve za metode GC/MS za presejalne in potrditvene namene

6.1 Sprejemljive razlike med rezultati WHO-TEQ na zgornji in spodnji meji

Razlika med vrednostmi na zgornji in spodnji meji ne presega 20 % za potrditev preseganja mejne vrednosti ali po potrebi pragov ukrepanja.

6.2 Nadzor izkoristkov

6.2.1 Dodajanje s ^{13}C označenih 2,3,7,8-klor substituiranih internih standardov za PCDD/F in s ^{13}C -označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB se izvede na samem začetku analizne metode, npr. pred ekstrakcijo, da se validira analizni postopek. Dodata se vsaj en kongener za vsako od tetra- do oktakloriranih homolognih skupin za PCDD/F in vsaj en kongener za vsako od homolognih skupin za dioksinom podobne PCB (ali vsaj en kongener za vsak masnospektrometričen izbran ion s funkcijo evidentiranja, ki se uporablja za spremljanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB). Pri potrjitvenih metodah se uporablja vseh 17 s ^{13}C označenih 2,3,7,8-substituiranih internih standardov za PCDD/F in vseh 12 s ^{13}C označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB.

6.2.2 Prav tako se določijo relativni odzivni faktorji za tiste kongenerje, za katere ni dodan noben od s ^{13}C označenih analogov z uporabo ustreznih raztopin za umerjanje.

6.2.3 Za krmo rastlinskega izvora in krmo živalskega izvora, ki vsebujeta manj kot 10 % maščob, je dodatek internih standardov pred ekstrakcijo obvezen. Za krmo živalskega izvora, ki vsebuje več kot 10 % maščob, se interni standardi dodajo pred ekstrakcijo maščob ali po njej. Izvede se ustrezna validacija učinkovitosti ekstrakcije, ki je odvisna od faze, pri kateri se dodajo interni standardi.

6.2.4 Pred analizo GC-MS se dodata 1 ali 2 (nadomestna) standarda za izračun izkoristka.

6.2.5 Zahteva se nadzor izkoristka. Pri potrditvenih metodah so izkoristki posameznih internih standardov v območju od 60 % do 120 %. Manjši ali večji izkoristki za posamezne kongenerje, zlasti za nekatere hepta- in oktaklorirane dibenzo-p-dioksine in dibenzofurane, so sprejemljivi, če njihov prispevek k vrednosti TEQ ne presega 10 % skupne vrednosti TEQ (na podlagi vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB). Pri presejalnih metodah GC-MS so izkoristki v območju od 30 % do 140 %.

6.3 Odstranitev motečih snovi

- PCDD/F se od motečih kloriranih spojin, kot so dioksinom nepodobni PCB in klorirani difenil etri, ločijo z ustreznimi kromatografskimi tehnikami (prednost imajo kolone iz florisila, aluminijevega oksida in/ali ogljika).
- Ločevanje izomerov s plinsko kromatografijo je < 25 % od vrha do vrha med 1,2,3,4,7,8-HxCDF in 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4 Umerjanje s standardno krivuljo

Obseg umeritvene krivulje zajema ustrezno območje mejne vrednosti ali pragov ukrepanja.

6.5 Posebna merila za potrditvene metode

- Za GC-HRMS:

Pri HRMS je ločljivost običajno večja od ali enaka 10 000 za celotni masni razpon pri 10-odstotni višini doline.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril za identifikacijo in potrditev, kot so opisana v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (Krma – Določevanje dioksinov in dioksinu podobnih PCB z GC-HRMS in indikatorjev PCB z GC-HRMS), in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani.

- Za GC-MS/MS:

Spremljanje najmanj dveh specifičnih prekurzorskih ionov, vsakega z enim posebnim ustreznim prehodnim produktom ionom za vse označene in neoznačene analite v okviru analize.

Največja dovoljena toleranca relativnega ionskega odziva je ± 15 % za izbrane produktne ione v primerjavi z izračunanimi ali izmerjenimi vrednostmi (povprečje umeritvenih standardov), ob uporabi enakih pogojev MS/MS, zlasti energije trka in tlak plina pri trku, za vsak prehod analita.

Ločljivost za vsak kvadrupol je treba določiti na ravni, ki je enaka ali višja od ravni ločljivosti masne enote (ločljivost masne enote: zadostna ločljivost, da se ločuje med dvema vrhovoma, ki sta oddaljena eno masno enoto), da se zmanjšajo mogoči moteči vplivi predpisanih analitov.

Izpolnjevanje nadaljnjih meril, kot so opisana v mednarodno priznanih standardih, kot je EN 16215:2012 (Krma – Določevanje dioksinov in dioksinu podobnih PCB z GC-HRMS in indikatorjev PCB z GC-HRMS), in/ali v metodah EPA 1613 in 1668, kot sta bili revidirani, razen zahteve po uporabi GC-HRMS.

7. Posebne zahteve za bioanalizne metode

Bioanalizne metode so metode, ki temeljijo na uporabi bioloških načel, kot so preskusi na celični osnovi, preskusi na osnovi receptorjev ali imunološki preskusi. V tej točki so določene splošne zahteve za bioanalizne metode.

S presejalno metodo se načeloma vzorec razvrsti kot skladen ali kot vzorec s sumom na neskladnost. V ta namen se izračunana vrednost BEQ primerja z izločitveno vrednostjo (glej točko 7.3). Vzorci pod izločitveno vrednostjo se ugotovijo za skladne, za tiste na tej meji ali nad njo pa se sumi, da niso skladni, zato jih je treba analizirati s potrditveno metodo. V praksi se vrednost BEQ, ki ustreza 2/3 mejne vrednosti, lahko uporabi kot izločitvena vrednost, če sta zagotovljena delež lažno skladnih rezultatov, ki je manjši od 5 %, in sprejemljiv delež lažno neskladnih rezultatov. Ker so mejne vrednosti ločene za PCDD/F ter za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, so za preverjanje skladnosti vzorcev brez frakcioniranja potrebne ustrezne izločitvene vrednosti za PCDD/F pri bioloških preskusih. Za preverjanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, je kot izločitvena vrednost primeren ustrezen delež zadevnega praga ukrepanja.

Če je okvirna vrednost izražena v BEQ, so rezultati vzorca v delovnem območju in presegajo prag poročanja (glej točki 7.1.1 in 7.1.6).

7.1 Ocena odzivnosti preskusa

7.1.1 Splošne zahteve

- Kadar se koncentracije izračunajo iz umeritvene krivulje TCDD, vrednosti na zgornjem koncu krivulje pokažejo veliko razliko (visok koeficient variacije (KV)). Delovno območje je območje, v katerem je KV manjši od 15 %. Spodnji del delovnega območja (prag poročanja) se določi najmanj trikrat višje od postopka s slepimi vzorci. Zgornji del delovnega območja običajno predstavlja vrednost EC₇₀ (70 % največje učinkovite koncentracije), vendar je ta nižje, če je KV v tem območju večji od 15 %. Delovno območje se določi med validacijo. Izločitvene vrednosti (glej točko 7.3) so popolnoma znotraj delovnega območja.
- Standardne raztopine in ekstrakti vzorcev se preskušajo s trikratno ali vsaj dvakratno analizo. Kadar se uporabijo dvakratne analize, standardne raztopine ali ekstrakti kontrolnih vzorcev, preskušani v 4 do 6 jamicah, razporejenih po plošči, pokažejo odziv ali koncentracijo (mogoče le v delovnem območju) na podlagi KV < 15 %.

7.1.2 Umerjanje

7.1.2.1 Umerjanje s standardno krivuljo

- Vrednosti v vzorcih se ocenijo tako, da se primerja odzivnost preskusa z umeritveno krivuljo TCDD (ali PCB 126 ali standardne mešanice PCDD/PCDF/dioksinom podobnih PCB) za izračun vrednosti BEQ v ekstraktu in pozneje v vzorcu.
- Umeritvena krivulja vsebuje 8 do 12 koncentracij (vsaj v dvojnikih), z zadostnimi koncentracijami v spodnjem delu krivulje (delovno območje). Posebna pozornost se nameni kakovosti prilagajanja krivulje v delovnem območju. Tako vrednost R² malo pripomore ali sploh ne pripomore k ocenjevanju ustreznosti prilagajanja pri nelinearni regresiji. Boljše prilagajanje se doseže z zmanjšanjem razlike med izračunanimi in ugotovljenimi vrednostmi v delovnem območju krivulje, na primer z zmanjšanjem vsote kvadratov ostankov.
- Ocenjena vrednost v ekstraktu vzorca se nato popravi glede na vrednost BEQ, izračunano za slepi vzorec matriksa ali topila (da se upoštevajo nečistoče iz uporabljenih topil in kemikalij), in navidezen izkoristek (izračunan iz vrednosti BEQ ustreznih referenčnih vzorcev z reprezentativnimi vzorci kongenerjev v območju mejne vrednosti ali praga ukrepanja). Za popravek v zvezi z izkoristkom je navidezni izkoristek v zahtevanem območju (glej točko 7.1.4.). Referenčni vzorci, ki se uporabijo za popravek v zvezi z izkoristkom, izpolnjujejo zahteve iz točke 7.2.

7.1.2.2 Umerjanje z referenčnimi vzorci

Druga možnost je, da se uporabi umeritvena krivulja, pripravljena iz vsaj štirih referenčnih vzorcev (glej točko 7.2.4): enega slepega matriksa ter treh referenčnih vzorcev z 0,5-kratno, 1-kratno in 2-kratno mejno vrednostjo ali pragom ukrepanja, zaradi česar popravek v zvezi s slepimi vrednostmi in izkoristkom ni več potreben, če se lastnosti matriksa referenčnih vzorcev ujemajo z lastnostmi matriksa neznanih vzorcev. V tem primeru se lahko odzivnost preskusa, ki ustreza 2/3 mejne vrednosti (glej točko 7.3), izračuna neposredno iz teh vzorcev in uporabi kot izločitvena vrednost. Za preverjanje vzorcev, ki presegajo pragove ukrepanja, je kot izločitvena vrednost primeren ustrezen delež teh pragov ukrepanja.

7.1.3 Ločeno določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB

Ekstrakti se lahko razdelijo v frakcije, ki vsebujejo PCDD/F in dioksinom podobne PCB, kar omogoča ločeno navedbo vrednosti TEQ za PCDD/F in dioksinom podobne PCB (v BEQ). Po možnosti se uporabi standardna umeritvena krivulja PCB 126 za oceno rezultatov za frakcijo, ki vsebuje dioksinom podobne PCB.

7.1.4 Navidezni izkoristki pri bioloških preskusih

„Navidezni izkoristek pri bioloških preskusih“ se izračuna iz ustreznih referenčnih vzorcev z reprezentativnimi vzorci kongenerjev v območju mejne vrednosti ali praga ukrepanja in se izrazi kot delež vrednosti BEQ v primerjavi z vrednostjo TEQ. Odvisno od uporabljene vrste preskusa in TEF ⁽¹³⁾ lahko razlike med faktorji TEF in REP za dioksinom podobne PCB povzročijo majhne navidezne izkoristke za dioksinom podobne PCB v primerjavi s PCDD/F. Če se izvaja ločeno določanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, navidezni izkoristki pri bioloških testih znašajo: za dioksinom podobne PCB od 20 % do 60 %, za PCDD/F od 50 % do 130 % (območja veljajo za umeritveno krivuljo TCDD). Ker se lahko prispevek dioksinom podobnih PCB k vsoti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB razlikuje pri različnih matriksih in vzorcih, se pri navidezni izkoristki pri bioloških preskusih za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB upoštevajo ta območja in navedeni izkoristki znašajo od 30 % do 130 %. Pri kakršni koli bistveni spremembi vrednosti TEF v zakonodaji Unije za PCDD/F in dioksinom podobne PCB je treba spremeniti ta območja.

7.1.5 Nadzor nad izkoristkom pri čiščenju

Izguba spojin pri čiščenju se preveri med validacijo. Za slepi vzorec z dodatkom mešanice različnih kongenerjev se opravi čiščenje (najmanj $n = 3$), nato pa se s potrditveno metodo preverita izkoristek in variabilnost. Izkoristek znaša od 60 % do 120 %, zlasti za kongenerje, ki k vrednosti TEQ v različnih mešanicah prispevajo več kot 10 %.

7.1.6 Prag poročanja

Za poročanje o vrednostih BEQ se prag poročanja določi na podlagi ustreznih vzorcev matriksov, ki vključujejo značilne vzorce kongenerjev, ne pa na podlagi umeritvene krivulje standardov zaradi manjše natančnosti v njenem spodnjem delu. Upoštevajo se učinki ekstrakcije in čiščenja. Prag poročanja se določi najmanj trikrat višje od postopka s slepimi vzorci.

7.2 Uporaba referenčnih vzorcev

7.2.1 Referenčni vzorci predstavljajo matriks vzorca, vzorce kongenerjev in območja koncentracij za PCDD/F in dioksinom podobne PCB v območju mejne vrednosti ali praga ukrepanja.

7.2.2 V vsako preskusno serijo se vključijo slepi matriks, in kadar to ni mogoče, postopek s slepimi vzorci in referenčni vzorec pri mejni vrednosti ali pragu ukrepanja. Ti vzorci se ekstrahirajo in preskušajo hkrati in pod enakimi pogoji. Referenčni vzorec pokaže izrazito večji odziv v primerjavi s slepim vzorcem, kar zagotavlja ustreznost preskusa. Navedeni vzorci se lahko uporabijo za popravek v zvezi s slepimi vrednostmi in izkoristkom.

7.2.3 Referenčni vzorci, ki se izberejo za popravek v zvezi z izkoristkom, so reprezentativni za preskusne vzorce, kar pomeni, da vzorci kongenerjev ne povzročijo prenizke ocene vrednosti.

7.2.4 Vključijo se lahko dodatni referenčni vzorci z npr. 0,5-kratno in 2-kratno mejno vrednostjo ali pragom ukrepanja, da se dokaže primerna učinkovitost preskusa v območju predpisane vrednosti za nadzor mejne vrednosti ali praga ukrepanja. Ti vzorci se lahko skupaj uporabijo za izračun vrednosti BEQ v preskusnih vzorcih (glej točko 7.1.2.2).

7.3 Določitev izločitvenih vrednosti

Določi se razmerje med bioanaliznimi rezultati v BEQ in rezultati potrditvene metode v TEQ, npr. z umeritvenimi preskusi v matriksu, ki vključujejo referenčne vzorce z dodatkom pri 0-kratni, 0,5-kratni, 1-kratni in 2-kratni mejni vrednosti s 6 ponovitvami pri vsaki vrednosti ($n = 24$). Na podlagi tega razmerja se lahko ocenijo korekcijski faktorji (za slepe vrednosti in izkoristek), vendar se preverijo v skladu s točko 7.2.2.

⁽¹³⁾ Sedan je zahteve temeljijo na TEF, ki so objavljeni v: M. Van den Berg in drugi, *Toxicological Sciences* 93 (2), str. 223–241 (2006).

Izločitvene vrednosti se določijo za sprejetje odločitev o skladnosti vzorca z mejnimi vrednostmi ali za nadzor pragov ukrepanja, če je to relevantno, glede na zadevne mejne vrednosti ali pragove ukrepanja, določene za PCDD/F in za dioksinom podobne PCB posebej ali za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB. Prikazuje jih *spodnja* končna točka porazdelitve bioanaliznih rezultatov (s popravkom v zvezi s slepimi vrednostmi in izkoristkom), ki ustreza odločitveni meji potrditvene metode na podlagi 95-odstotne stopnje zaupanja, kar pomeni, da je delež lažno skladnih rezultatov < 5 %, in na podlagi $RSD_R < 25$ %. Odločitvena meja potrditvene metode je mejna vrednost ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti.

Izločitvena vrednost (v BEQ) se lahko izračuna po enem od pristopov iz točk 7.3.1, 7.3.2 in 7.3.3 (glej sliko 1).

7.3.1 Uporaba *spodnjega* razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji potrditvene metode

$$\text{Izločitvena vrednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pri čemer je:

BEQ_{DL}	BEQ, ki ustreza odločitveni meji potrditvene metode, ki je mejna vrednost ob upoštevanju razširjene merilne negotovosti
$s_{y,x}$	standardni odklon ostankov
$t_{\alpha, f=m-2}$	Studentov faktor ($\alpha = 5$ %, $f =$ prostostna stopnja, enostranska)
m	skupno število umeritvenih točk (indeks j)
n	število ponovitev na vsaki stopnji
x_i	koncentracija vzorca (v TEQ) umeritvene točke i , določena s potrditveno metodo
$\bar{x}$	povprečje koncentracij (v TEQ) vseh umeritvenih vzorcev
$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$	parameter vsote kvadratov, $i =$ indeks za umeritveno točko i

7.3.2 Izračun na podlagi bioanaliznih rezultatov (s popravkom slepih vrednosti in izkoristka) večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji potrditvene metode, kot *spodnja* vrednost porazdelitve podatkov pri ustreznih povprečnih vrednostih BEQ:

$$\text{Cut-off value} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

pri čemer je:

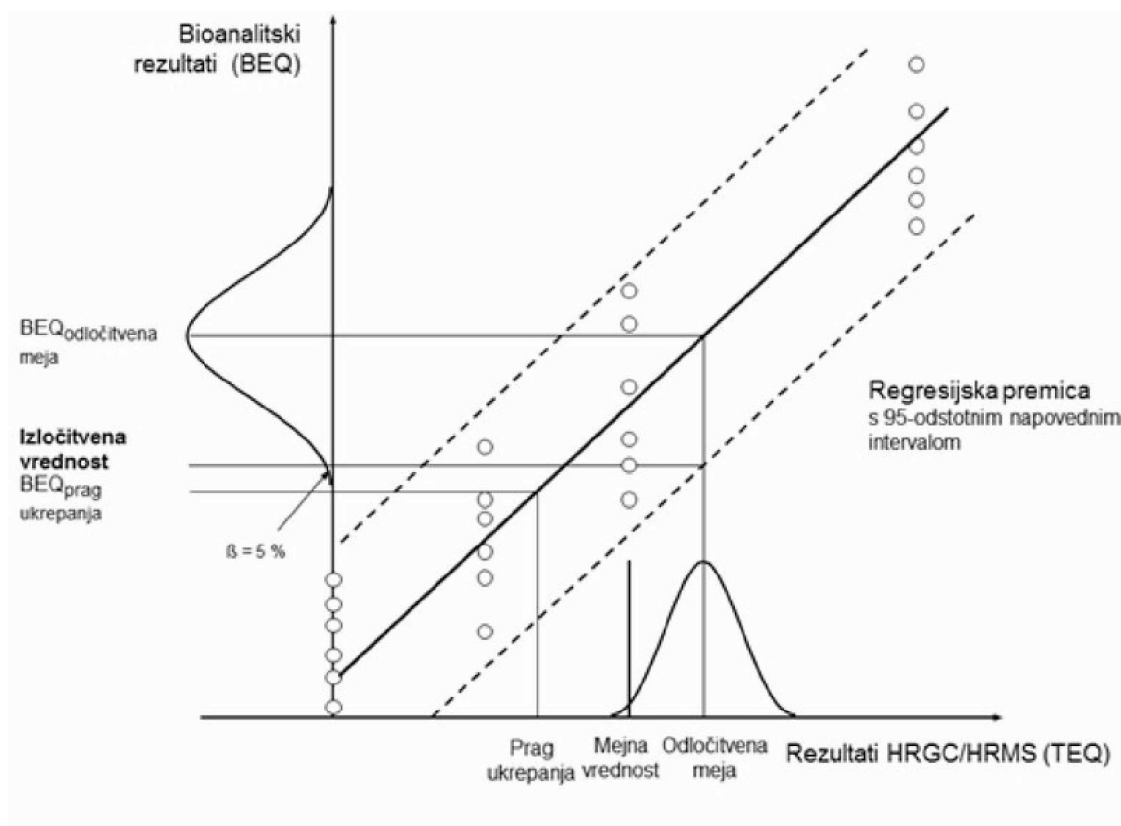
SD_R	standardni odklon rezultatov bioloških preskusov pri BEQ_{DL} , izmerjen pri pogojih interne laboratorijske obnovljivosti
---------------	---

7.3.3 Izračun kot srednja vrednost bioanaliznih rezultatov (v BEQ, s popravkom slepih vrednosti in izkoristka) iz večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri dveh tretjinah mejne vrednosti ali praga ukrepanja, na podlagi ugotovitve, da bo ta vrednost v območju izločitvene vrednosti iz točke 7.3.1 ali 7.3.2:

Izračun izločitvenih vrednosti na podlagi 95-odstotne stopnje zaupanja, kar pomeni, da je delež lažno skladnih rezultatov < 5 %, in na podlagi $RSD_R < 25$ %:

- (1) na podlagi *spodnjega* razpona 95-odstotnega napovednega intervala pri odločitveni meji potrditvene metode,
- (2) na podlagi večkratnih analiz vzorcev ($n \geq 6$), kontaminiranih pri odločitveni meji potrditvene metode, kot *spodnja* končna točka porazdelitve podatkov (na Sliki 1 prikazana s krivuljo v obliki zvonca) pri ustreznih povprečnih vrednostih BEQ.

Slika 1



7.3.4 Omejitve izločitvenih vrednosti

Izločitvene vrednosti na podlagi BEQ, izračunane iz RSD_R , dosežene med validacijo z uporabo omejenega števila vzorcev z različnimi vzorci pojavljanja matrikov/kongenerjev, so lahko višje od mejnih vrednosti ali pragov ukrepanja na podlagi TEQ zaradi večje natančnosti, kot jo je mogoče doseči rutinsko, ko je treba nadzirati neznan spekter mogočih vzorcev kongenerjev. V takih primerih se izločitvene vrednosti izračunajo iz $RSD_R = 25\%$ ali pa se da prednost dvema tretjinama mejne vrednosti ali praga ukrepanja.

7.4 Značilnosti učinkovitosti metode

7.4.1 Ker pri bioanaliznih metodah ni mogoče uporabiti internih standardov, se opravijo preskusi ponovljivosti bioanaliznih metod, da se pridobijo informacije o standardnem odklonu v preskusnih serijah in med njimi. Ponovljivost mora biti pod 20% , interna laboratorijska obnovljivost pa pod 25% . To temelji na izračunanih vrednostih v BEQ po popravku v zvezi s slepimi vrednostmi in izkoristkom.

7.4.2 V postopku validacije se dokaže, da preskus razlikuje med slepim vzorcem in vsebnostjo pri izločitveni vrednosti ter omogoča identifikacijo vzorcev nad ustrezno izločitveno vrednostjo (glej točko 7.1.2).

7.4.3 Opredelijo se ciljne spojine, mogoči moteči vplivi in mejne sprejemljive slepe vrednosti.

7.4.4 Odstotni standardni odklon v odzivu ali koncentraciji, izračunani iz odziva (mogoče le v delovnem območju), pri trikratnem določanju ekstrakta vzorca ne presega 15% .

7.4.5 Nepopravljeni rezultati referenčnih vzorcev, izraženi v BEQ (slepa vrednost in mejna vrednost ali prag ukrepanja), se uporabijo za oceno učinkovitosti bioanalizne metode v stalnem časovnem presledku.

- 7.4.6 Za postopke s slepimi vzorci in vsako vrsto referenčnega vzorca se vodijo in preverjajo karte za nadzor kakovosti, s čimer se zagotovi, da je analizna učinkovitost v skladu z zahtevami, zlasti pri postopkih s slepimi vzorci glede zahtevane najmanjše razlike do spodnjega dela delovnega območja in pri referenčnih vzorcih glede interne laboratorijske obnovljivosti. Postopki s slepimi vzorci se nadzorujejo tako, da se je mogoče izogniti lažno skladnim rezultatom pri odštevanju.
- 7.4.7 Rezultati analiz sumljivih vzorcev s potrditveno metodo in od 2 % do 10 % skladnih vzorcev (najmanj 20 vzorcev na matriks) se zberejo in uporabijo za oceno učinkovitosti presejalne metode ter razmerja med BEQ in TEQ. Ta zbirka podatkov se lahko uporabi za ponovno oceno izločitvenih vrednosti, ki se uporabljajo za rutinske vzorce pri validiranih matriksih.
- 7.4.8 Uspešnost metode se lahko dokaže tudi s sodelovanjem v krožnih preskusih. Rezultati vzorcev, analiziranih s krožnimi preskusi, ki zajemajo območje koncentracije do npr. dvakratne mejne vrednosti, se lahko vključijo v oceno deleža lažno skladnih rezultatov, če laboratorij lahko dokaže svojo učinkovitost. Vzorci zajemajo najpogostejše vzorce pojavljanja kongenerjev, ki predstavljajo različne vire.
- 7.4.9 Med incidenti se izločitvene vrednosti lahko ponovno ocenijo, pri čemer se upoštevajo posebni vzorci matriksov in kongenerjev v zadevnem incidentu.

8. Poročanje o rezultatih

8.1 *Potrditvene metode*

- 8.1.1 Analizni rezultati vsebujejo vrednosti posameznih kongenerjev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB, vrednosti TEQ pa se sporočijo kot vrednosti na spodnji meji, zgornji meji in srednji meji, da se v poročilo o rezultatih vključi čim več podatkov in tako omogoči razlaga rezultatov glede na posebne zahteve.
- 8.1.2 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.
- 8.1.3 Izkoristki posameznih internih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 6.2.5, če je presežena mejna vrednost (v tem primeru izkoristki za eno od dveh dvakratnih analiz) in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 8.1.4 Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati razširjeno merilno negotovost, se ta parameter da na voljo. Rezultat analize se zato izrazi kot $x \pm U$, pri čemer je x rezultat analize, U pa razširjena merilna negotovost, kar pri faktorju zajetja 2 pomeni približno 95-odstotno stopnjo zaupanja. Pri ločenem določanju PCDD/F in dioksinom podobnih PCB se vsota ocenjene razširjene merilne negotovosti ločenih rezultatov analize vsebnosti PCDD/F in dioksinom podobnih PCB uporablja za vsoto PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.
- 8.1.5 Rezultati se izrazijo z istimi enotami in z vsaj enakim številom signifikantnih števk kot pri mejnih vrednostih iz Direktive 2002/32/ES.

8.2 *Bioanalizne presejalne metode*

- 8.2.1 Rezultat presejanja se navede kot ‚skladen‘ ali pa kot rezultat ‚s sumom na neskladnost‘ (‚sumljiv‘).
- 8.2.2 Poleg tega se lahko navede okvirni rezultat za PCDD/F in/ali dioksinom podobne PCB, izražen v BEQ in ne TEQ.
- 8.2.3 Za vzorce, pri katerih je odziv pod pragom poročanja, se navede, da so ‚pod pragom poročanja‘. Za vzorce, pri katerih je odziv nad delovnim območjem, se navede, da ‚presejajo delovno območje‘, vrednost, ki ustreza zgornjemu delu delovnega območja, pa se navede v BEQ.
- 8.2.4 Za vsako vrsto matriksa vzorca se v poročilu navede mejna vrednost ali prag ukrepanja, na katerem temelji ocena.

- 8.2.5 V poročilu se navedejo vrsta uporabljenega preskusa, osnovno načelo preskusa in vrsta umerjanja.
- 8.2.6 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.
- 8.2.7 Če obstaja sum, da vzorci niso skladni, mora poročilo vključevati navodilo glede potrebnih ukrepov. Koncentracijo PCDD/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v navedenih vzorcih s povišanimi vsebnostmi je treba določiti/potrditi s potrditveno metodo.
- 8.2.8 Neskladni rezultati se sporočijo samo po potrditveni analizi.
- 8.3 *Fizikalno-kemijske presejalne metode*
- 8.3.1 Rezultat presejanja se navede kot ‚skladen‘ ali pa kot rezultat ‚s sumom na neskladnost‘ (‚sumljiv‘).
- 8.3.2 Za vsako vrsto matriksa vzorca se v poročilu navede mejna vrednost ali prag ukrepanja, na katerem temelji ocena.
- 8.3.3 Poleg tega se lahko navedejo vrednosti posameznih kongenerjev PCDD/F in dioksinom podobnih PCB ter vrednosti TEQ, ki se sporočijo kot vrednosti na spodnji meji, zgornji meji in srednji meji. Rezultati se izrazijo z istimi enotami in z vsaj enakim številom signifikantnih števk kot pri mejnih vrednostih iz Direktive 2002/32/ES.
- 8.3.4 Izkoristki posameznih internih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 6.2.5, če je presežena mejna vrednost (v tem primeru izkoristki za eno od dveh dvakratnih analiz) in na zahtevo tudi v drugih primerih.
- 8.3.5 V poročilu se navede uporabljena metoda GC-MS.
- 8.3.6 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCDD/F in dioksinom podobnih PCB.
- 8.3.7 Če obstaja sum, da vzorci niso skladni, mora poročilo vključevati navodilo glede potrebnih ukrepov. Koncentracijo PCDD/F ter vsote PCDD/F in dioksinom podobnih PCB v navedenih vzorcih s povišanimi vsebnostmi je treba določiti/potrditi s potrditveno metodo.
- 8.3.8 Odločitev o neskladnosti se lahko sprejme samo po potrditveni analizi.

POGLAVJE III

PRIPRAVA VZORCA IN ZAHTEVE ZA ANALIZNE METODE ZA URADNI NADZOR VSEBNOSTI DIOKSIOM NEPODOBNIH PCB V KRMI

1. Področje uporabe

Zahteve, določene v tem poglavju, se uporabijo, kadar se krma analizira za uradni nadzor vsebnosti dioksinom nepodobnih PCB, ter za pripravo vzorcev in analizne zahteve za druge regulativne namene, kar vključuje nadzor, ki ga izvajajo nosilci dejavnosti poslovanja s krmo za zagotovitev skladnosti z določbami Uredbe (ES) št. 1831/2005.

2. Metode ugotavljanja, ki se uporabljajo

Plinska kromatografija/detekcija zajetja elektronov (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ali enakovredne metode.

3. Identifikacija in potrditev predpisanih analitov

- 3.1 Relativni retencijski čas glede na interne standarde ali referenčne standarde (sprejemljivi odklon $\pm 0,25$ %).

- 3.2 Ločevanje dioksinom nepodobnih PCB od motečih snovi, zlasti sočasno eluiranih PCB, s plinsko kromatografijo, še posebej če so vrednosti vzorcev v območju zakonsko dovoljenih mej in je treba potrditi neskladnost ⁽¹³⁾.

3.3 Zahteve za tehnike GC-MS

Spremljanje najmanj naslednjega števila molekularnih ionov ali značilnih ionov iz grozda molekul:

- (a) dveh specifičnih ionov za HRMS;
- (b) treh specifičnih ionov za LRMS;
- (c) dveh specifičnih prekurzorskih ionov, vsakega z enim posebnim prehodnim produktnim ionom za MS-MS.

Največja dovoljena odstopanja za razmerja zastopanosti izbranih masnih fragmentov:

relativni odklon razmerja zastopanosti izbranih masnih fragmentov od teoretične zastopanosti ali umeritvenega standarda za ciljni ion (ion z največjo zastopano, ki se spremlja) in potrditvene ione: $\pm 15\%$.

3.4 Zahteve za tehnike GC-ECD

Rezultati, ki presegajo mejno vrednost, se potrdijo z dvema kolonama GC s stacionarnima fazama različne polarnosti.

4. **Dokazovanje učinkovitosti metode**

Učinkovitost metode se validira v območju mejne vrednosti (0,5-kratna do 2-kratna mejna vrednost) s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize (glej zahteve za vmesno natančnost v točki 9).

5. **Meja določljivosti**

Vsota LOQ ⁽¹⁴⁾ dioksinom nepodobnih PCB ne presega tretjine mejne vrednosti ⁽¹⁵⁾.

6. **Nadzor kakovosti**

Redni slepi nadzor, analiza cepljenih vzorcev, vzorci za nadzor kakovosti, sodelovanje v medlaboratorijskih študijah z relevantnimi matriksi.

7. **Nadzor izkoristkov**

- 7.1 Uporabljajo se primerni interni standardi s fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki so primerljive s tistimi, ki jih imajo predpisani analiti.

- 7.2 Dodajanje internih standardov:

dodajanje proizvodom (pred ekstrakcijo in čiščenjem).

- 7.3 Zahteve za metode, pri katerih se uporablja vseh šest izotopsko označenih kongenerjev dioksinom nepodobnih PCB:

- (a) rezultati se popravijo glede izkoristka internih standardov;
- (b) izkoristek izotopsko označenih internih standardov je med 60 % in 120 %;
- (c) sprejemljivi so manjši ali večji izkoristki za posamezne kongenerje z manj kot 10-odstotnim prispevkom k vsoti dioksinom nepodobnih PCB.

⁽¹³⁾ Kongenerji, za katere je pogosto ugotovljeno, da se sočasno eluirajo, so npr. PCB 28/31, PCB 52/69 in PCB 138/163/164. Pri GC-MS se upoštevajo tudi mogoči moteči vplivi fragmentov višjih kloriranih kongenerjev.

⁽¹⁴⁾ Kadar je primerno, se upoštevajo načela, kot so opisana v smernicah za ocenjevanje meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) za meritve na področju onesnaževal v krmi in živilih (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>).

⁽¹⁵⁾ Zelo priporočljivo je, da je prispevek slepega reagenta k vsebnosti onesnaževala v vzorcu manjši. Laboratorij je odgovoren za nadzor spreminjanja slepih vrednosti, zlasti če se slepe vrednosti odštejejo.

7.4 Zahteve za metode, pri katerih se ne uporablja vseh šest izotopsko označenih internih standardov ali drugi interni standardi:

- (a) izkoristek internih standardov se nadzoruje za vsak vzorec;
- (b) izkoristki internih standardov so med 60 % in 120 %;
- (c) rezultati se popravijo glede izkoristkov internih standardov.

7.5 Izkoristki neoznačenih kongenerjev se preverijo z analizo cepljenih vzorcev ali vzorcev za nadzor kakovosti s koncentracijami v območju mejne vrednosti. Izkoristki teh kongenerjev se štejejo za sprejemljive, če so med 60 % in 120 %.

8. Zahteve za laboratorije

V skladu z določbami Uredbe (EU) št. 2017/625 laboratorije akreditirajo priznani organi, ki delujejo v skladu z zahtevami vodnika ISO/IEC 58, s čimer je zagotovljeno, da izvajajo analizo zagotavljanje kakovosti. Laboratoriji se akreditirajo po standardu EN ISO/IEC 17025. Poleg tega se upoštevajo načela, kot so opisana v tehničnih smernicah za oceno merilne negotovosti in mej določljivosti za analizo vsebnosti PCB ⁽¹⁶⁾.

9. Značilnosti učinkovitosti metode: Merila za vsoto dioksinom nepodobnih PCB pri mejni vrednosti

	Izotopska razredčitev – masna spektrometrija (*)	Druge tehnike
Pravilnost	– 20 % do + 20 %	– 30 % do + 30 %
Vmesna natančnost (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Razlika med izračunom na zgornji in spodnji meji	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) Potrebna je uporaba vseh šestih ¹³C označenih analogov kot internih standardov.

10. Poročanje o rezultatih

10.1 Analizni rezultati vsebujejo vrednosti posameznih dioksinom nepodobnih PCB ter vsoto kongenerjev navedenih PCB, sporočijo pa se kot vrednosti na spodnji meji, zgornji meji in srednji meji, da se v poročilo o rezultatih vključi čim več podatkov in tako omogoči razlaga rezultatov glede na posebne zahteve.

10.2 Poročilo vključuje metodo, uporabljeno za ekstrakcijo PCB.

10.3 Izkoristki posameznih internih standardov so na voljo, če so zunaj območja iz točke 7, če je presežena mejna vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.

10.4 Ker je treba pri odločanju o skladnosti vzorca upoštevati razširjeno merilno negotovost, se da na voljo tudi navedeni parameter. Rezultat analize se zato izrazi kot $x \pm U$, pri čemer je x rezultat analize, U pa razširjena nezanesljivost meritve, kar pri količniku zajetja 2 pomeni približno 95-odstotno stopnjo zaupanja.

10.5 Rezultati se izrazijo z istimi enotami in z vsaj enakim številom signifikantnih števk kot pri mejnih vrednostih iz Direktive 2002/32/ES.

⁽¹⁶⁾ Glej opombo 9.

B. STANDARDI EN

Za uporabo člena 34(2)(a) Uredbe (EU) 2017/625 so pomembni naslednji standardi EN:

EN 17194: Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje deoksinivalenola, aflatoksina B1, fumonizina B1 in B2, toksinov T-2 in HT-2, zearalenona in ohratoksina A v sestavinah krme in krmni mešanici z LC-MS/MS.

EN 17270: Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje teobromina v sestavinah krme in krmnih mešanicah, vključno s pridobljenimi sestavinami iz kakava, s tekočinsko kromatografijo.

EN 17504 Krma: metode vzorčenja in analize – Ugotavljanje gosipola v bombažnem semenu in krmi z LC-MS/MS.

EN 17362 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje pentaklorofenola (PCP) v sestavinah krme in krmni mešanici z LC-MS/MS

EN 16279: Živalska krma – Določevanje fluorida po obdelavi s solno kislino z metodo ionsko občutljive elektrode (ISE).

EN 17053: Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje elementov v sledovih, težkih kovin in drugih elementov v krmi z ICP-MS (večelementna metoda).

EN 15550 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje kadmija in svinca z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (GF-AAS) z grafitno kiveto po razklopu pod tlakom

EN 16206 Krma – Določevanje arzena s hidridno atomsko absorpcijsko spektrometrijo (HGAAS) po mikrovalovnem razklopu (razklop s 65 % dušikovo kislino in 30 % vodikovim peroksidom).

EN 16277 Živalska krma – Določevanje živega srebra z atomsko absorpcijsko spektrometrijo hladnih par (CVAAS) po mikrovalovnem razklopu pod tlakom (ekstrakcija s 65 % dušikovo kislino in 30 % vodikovim peroksidom).

EN 16278 Živalska krma – Določevanje anorganskega arzena s hidridno atomsko absorpcijsko spektrometrijo (HG-AAS) po mikrovalovni ekstrakciji in ločevanju z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

EN 17374 Krma: metode vzorčenja in analize – Določevanje anorganskega arzena v krmi z anionsko izmenjevalno HPLC-ICP-MS.“.

PRILOGA VI

„PRILOGA VII

METODA IZRAČUNA ENERGIJSKE VREDNOSTI KRME ZA PERUTNINO**1. METODA IZRAČUNA IN PRIKAZA ENERGIJSKE VREDNOSTI**

Energijska vrednost krme za perutnino mora biti izračunana v skladu s formulo, določeno v nadaljnjem besedilu, na podlagi odstotkov nekaterih analiznih sestavin krme. Ta vrednost se izrazi v megajoulih (MJ) presnovne energije (ME), popravljeno za dušik, na kilogram krmne mešanice:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ surovih beljakovin} + 0,3431 \times \% \text{ surovih maščob} + 0,1669 \times \% \text{ škroba} + 0,1301 \times \% \text{ celotnega sladkorja (izraženega kot saharoza)}.$$

2. ODPSTOPANJA, KI SE UPORABLJAJO ZA OZNAČENE VREDNOSTI

Če se v okviru uradnega pregleda odkrije razlika (povečana ali zmanjšana energijska vrednost krme) med rezultatom pregleda in označeno energijsko vrednostjo, je dovoljeno minimalno odstopanje 0,4 MJ/kg ME.

3. PRIKAZ REZULTATOV

Po uporabi zgoraj navedene formule je treba dobljeni rezultat izraziti z eno decimalko.

4. METODE VZORČENJA IN ANALIZNE METODE

Vzorčenje krmnih mešanic in določanje vsebnosti analiznih sestavin, navedenih v metodi izračuna, je treba izvesti v skladu z metodami Unije za vzorčenje ali analiznimi metodami Unije za uradni pregled krme.

Uporablja se naslednje:

- za določanje vsebnosti surovih maščob: postopek B metode za določanje surovih olj in maščob iz dela G Priloge III,
- za določanje vsebnosti škroba: polarimetrična metoda iz dela K Priloge III.

METODA IZRAČUNA ENERGIJSKE VREDNOSTI V POSAMIČNIH KRMILIH IN KRMNIH MEŠANICAH ZA MAČKE IN PSE

Energijska vrednost v posamičnih krmilih in krmnih mešanicah za mačke in pse se izračuna v skladu s standardom EN 16967 Krma: metode vzorčenja in analize – Napovedne enačbe za presnovno energijo v krmilih in krmnih mešanicah (hrane za hišne živali) za mačke in pse, vključno z dietično hrano“.