

METODE ZA UZIMANJE UZORAKA ZA LABORATORIJSKA ISPITIVANJA HRANE ZA ŽIVOTINJE

Dio I

Način uzimanja uzoraka

Uzorci za službenu kontrolu hrane za životinje uzimaju se u skladu sa metodama kao reprezentativni uzorci. $A = \pi r^2$

Reprezentativni uzorak se dobija iz manje količine i/ili serije za određivanje bilo kojeg posebnog svojstva te količine što predstavlja srednju vrijednost svojstva serije.

Uzimanje uzoraka iz serija vrši se uzimanjem pojedinačnih uzoraka iz različitih položaja u seriji, a pojedinačni uzorci kombinuju se miješanjem radi formiranja zbirnog uzorka iz kojeg se reprezentativnim dijeljenjem pripremaju reprezentativni konačni uzorci.

Ako se vizuelnim pregledom utvrdi razlika u kvalitetu dijelova hrane za životinje koja se uzorkuje u odnosu na preostali dio iste serije, ti dijelovi razdvajaju se od ostatka hrane za životinje i sa njima se postupa kao sa odvojenom podserijom, a ako nije moguće podijeliti hranu za životinje u odvojene podserije, hrana za životinje uzorkuje se kao jedna serija i taj podatak se navodi u izvještaju o uzimanju uzoraka.

Uzeti uzorak hrane za životinje treba da bude zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata, a oznaka pečata treba da bude jasno prepoznatljiva i vidljiva.

Uzeti uzorak hrane za životinje može se staviti u posudu koja se zatvara na način da se ne može otvoriti bez oštećenja posude čime se izbjegava ponovno korišćenje te posude.

Uzeti uzorak hrane za životinje treba da bude neizbrisivo označen i identifikovan na način da postoji nedvosmislena veza sa izvještajem o uzorku.

Dio II

Opšte odredbe

Uzorke uzimaju lica ovlaštena od strane nadležnog tijela.

Za uzorak iz prodaje na daljinu nadležno tijelo sredstvom komuniciranja na daljinu od subjekta u poslovanju s hranom za životinje traži određenu količinu hrane za životinje.

Uzorak mora biti zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata. Oznaka pečata treba biti jasno prepoznatljiva i vidljiva.

Uzorak mora biti označen neizbrisivom oznakom i identifikovan na način da postoji nedvosmislena veza sa izvještajem o uzorkovanju.

Iz svakog grupnog ili redukovano uzorka uzimaju se konačni uzorci:

- jedan za potrebe sprovođenja kontrole;

- jedan za subjekt u poslovanju s hranom za životinje (u slučaju pokretanja žalbenog postupka).

Može se uzeti i još jedan konačni uzorak za referencu. Ako je grupni uzorak homogenizovan, konačni uzorci uzimaju se iz homogenizovanog grupnog uzorka, osim ako je takav postupak u suprotnosti sa pravima subjekta u poslovanju s hranom za životinje.

Ako je za obavljanje službenog uzorkovanja potrebno, subjekti u poslovanju s hranom za životinje na zahtjev nadležnog tijela licima ovlaštenim od strane nadležnog tijela omoguće pristup opremi koja je pod njihovim nadzorom, uključujući, prema potrebi, stavljanje na raspolaganje odgovarajuće opreme za uzorkovanje i lične zaštitne opreme, pomažu i saraduju s ovlaštenim licima kako bi se omogućilo uzorkovanje.

Dio III

Oprema za uzimanje uzoraka

Oprema za uzimanje uzoraka treba da je izrađena od materijala koji ne može kontaminirati proizvode namijenjene uzorkovanju. Oprema koja je namijenjena višestrukoj upotrebi treba da bude jednostavna za čišćenje kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija. Za ručno uzimanje uzoraka čvrste hrane za životinje koristi se sljedeća oprema:

- lopatica sa ravnim dnom i vertikalnim stranicama;

- sonda za uzimanje uzoraka sa dugim prorezom ili pregradama.

Dimenzije sonde za uzimanje uzoraka treba da odgovaraju osobinama uzorka (dubina posude, veličina vreće) i veličini čestica hrane za životinje, a ako sonda za uzimanje uzoraka ima nekoliko otvora, oni se odvajaju pregradama ili raspoređenim otvorima kako bi se obezbijedilo da se uzorak uzima na različitim mjestima uzduž sonde.

Za mehaničko uzimanje uzoraka hrane za životinje koja je u pokretu može se koristiti odgovarajuća mehanička oprema kojom se može uzorkovati najmanje čitav dio protoka, a uzimanje uzoraka hrane za životinje u pokretu (pri velikim brzinama protoka) može se sprovesti automatizovanom opremom. Za razdvajanje uzorka na približno jednake dijelove koristi se oprema za pripremu redukovanih uzoraka na reprezentativan način (djeloci) prema potrebi.

Dio IV

Količina i broj pojedinačnih uzoraka

Broj pojedinačnih uzoraka utvrđenih iz tač. 1.1. i 1.2 ovog dijela primjenjuju se za uzorkovane dijelove u količinama do najviše 500 tona koji se mogu uzorkovati na reprezentativan način, a postupak uzimanja uzoraka odnosi se i za količine veće od propisane maksimalne količine uzorkovanog dijela, pod uslovom da se najveći broj pojedinačnih uzoraka iz Tabele 1 ne uzima u obzir, već se broj pojedinačnih uzoraka određuje formulom kvadratnog korjena u skladu sa tačkom 1.3. ovog dijela, a najmanja zbirna količina uzorka proporcionalno se uvećava, s tim da se ne sprječava razdvajanje velike serije u nekoliko manjih podserija i uzimanje uzoraka svake podserije u skladu sa tač. 1.1. i 1.2 ovog dijela.

Veličina uzorkovanog dijela treba da bude takva da svaki od njegovih sastavnih dijelova može biti uzorkovan.

Za jako velike serije ili podserije (> 500 tona) i za serije koje se prevoze ili skladište na takav način da je uzimanje uzoraka nemoguće u skladu sa tač. 1.1. i 1.2. ovog dijela primjenjuje se postupak uzimanje uzoraka iz tačke 1.3.

U slučaju prodaje uzoraka na daljinu kada nije poznata veličina serije iz koje se uzima uzorak primjenjuje postupak opisan u tački 11.

U okviru obaveznog sistema praćenja, subjekat u poslovanju s hranom za životinje može odstupati od količinskih zahtjeva predviđenih ovom tačkom kako bi se u obzir uzela operativne karakteristike pod uslovom da je postupak uzorkovanja u pogledu reprezentativnosti izvršen nakon dobijanja odobrenja nadležnog tijela.

Ako nije moguće uzeti uzorake zbog neprihvatljive komercijalne štete na seriji (zbog oblika pakovanja, prevoznih sredstava, načina skladištenja), može se primijeniti alternativni način uzimanje uzoraka pod uslovom da je što reprezentativniji i u potpunosti opisan i dokumentovan.

1.1. Količina pojedinačnih uzoraka pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno zastupljenih u čvrstoj hrani za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tone	7
> 2,5 tone	Kvadratni korjen iz broja tona od kojeg je napravljen uzorkovani dio prethodno pomnožen sa 20*, do 40 pojedinačnih uzoraka
*-Kada dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.	

1.2 Količina pojedinačnih uzoraka pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno zastupljenih u tečnoj hrani za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tone ili ≤ 2 500 litara	4*
>2,5 tone ili >2 500 litara	7*
*-Ako nije moguće dobiti homogenu tečnost, povećava se broj pojedinačnih uzoraka.	

1.3 Upakovana hrana za životinje

Hrana za životinje (u čvrstom ili tečnom stanju) može se pakovati u vreće, limenke, bačve (u daljem tekstu: jedinice).

Velike jedinice (≥ 500 kg ili litara) uzorkuju se skladu sa u skladu sa tač. 1.1. i 1.2. ovog dijela, za hranu za životinje u rasutom stanju.

Veličina uzorkovanog dijela	Minimalan broj jedinica (najmanje jedna) namijenjenih uzimanju pojedinačnog uzorka*
1 do 20 jedinica	1 jedinica**
21 do 150 jedinica	3 jedinice**

151 do 400 jedinica	5 jedinica**
>400 jedinica	Jedna četvrtina kvadratnog korijena iz broja jedinica u uzorkovanom dijelu***, do 40 jedinica

*-U slučaju kada otvaranje jedinice može uticati na analizu (npr. kvarljiva vlažna hrana za životinje), neotvorena jedinica služi kao pojedinačni uzorak.

** -Za jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kilogram ili jedan litar, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice.

***-Kad dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.

1.4 Krmni blokovi i kameni za lizanje

Najmanje 1 blok ili kamen za lizanje za uzorkovanje po uzorkovanom dijelu od 25 jedinica, do najviše 4 bloka ili kamena za lizanje.

Za blokove ili kamene za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak sadrži jedan blok ili jedan kamen za lizanje.

1.5 Voluminozna hraniva/krmno bilje

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka*
≤ 5 tona	5
>5 tona	Kvadratni korjen iz broja tona od kojeg je napravljen uzorkovani dio prethodno pomnožen sa 5**, do 40 pojedinačnih uzoraka
*-Uzima se u obzir da u određenim situacijama (npr. kod silaža) nije moguće uzeti potrebne pojedinačne uzorke bez uzrokovanja neprihvatljive štete na seriji. U tim situacijama može se primijeniti druga metoda uzimanje uzoraka, a smjernice za uzimanje uzoraka takvih serija objasniti će se prije stupanja na snagu ove Uredbe.	
**-Kada dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.	

1.6 Količina pojedinačnih uzoraka za kontrolu materija ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje

Količine pojedinačnih uzoraka koriste se za:

-kontrolu aflatoksina, raženih gljivica, ostalih mikotoksina i štetnih botaničkih nečistoća u hrani za životinje;

-kontrola unakrsne kontaminacije sastojkom, uključujući i genetski modificirani materijal, ili materija za koju se očekuje neujednačena distribucija u hrani za životinje.

Ukoliko postoji osnovana sumnja za postojanje neujednačene distribucije i u slučaju unakrsne kontaminacije sastojkom ili materijom u krmnoj smješi, primjenjuju se količine uzorka date u sljedećoj tabeli.

Tabela

Količina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
< 80 tona	količine iz tačke 1.1 ovog dijela, broj pojedinačnih zahtjeva koji se moraju uzeti množi se sa 2,5.
≥ 80 tona	100

1.7. Količina pojedinačnih uzoraka kod velikih serija

U slučaju velikih djelova (uzorkovani djelovi > 500 tona), broj pojedinačnih uzoraka namijenjenih uzorkovanju = 40 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korjen iz količine tona pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u cijelom uzorku ili 100 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korjen iz količine tona pri kontroli sastojaka ili materija vjerovatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje.

Dio V
KOLIČINA ZBIRNIH UZORAKA

Vrste hrane za životinje za koje je potreban je samo jedan zbirni uzorak		
	Vrsta hrane za životinje	Najmanji veličina zbirnog uzorka (*) (**)
1.	Hrana za životinje u rasutom stanju	4 kg
2.	Pakovana hrana za životinje	4 kg***
3.	Tečna ili polutečna hrana za životinje	4 l
4.	Krmni blokovi ili kamene soli za lizanje	
1.4.1.	pojedinačne mase veće od 1 kg	4 kg
1.4.2.	pojedinačne mase ne veće od 1 kg	masa četiri originalna bloka ili kamena za lizanje
5.	Voluminozna hrana/hranivo	4 kg****

*-Ako se uzorkuje hrana za životinje visoke vrijednosti, može se uzeti manja količina zbirnog uzorka pod uslovom da se to opiše i navede u zapisniku o uzimanju uzoraka.
** -U skladu sa odredbama posebnog propisa o utvrđivanju metoda uzimanja uzoraka i analize za službenu kontrolu hrane za životinje, uzimajući u obzir prisustvo genetski modifikovanog materijala za koji je postupak odobravanja u toku ili je odobrenje isteklo, zbirni uzorak za kontrolu prisustva genetski modifikovanog materijala mora da sadrži najmanje 35 000 sjemenki/zrna, a veličina zbirnog uzorka za kukuruz mora da bude najmanje 10,5 kg, a za soju 7 kg, a za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, ovas, pirinač, raž, pšenica i sjeme repe, zbirna veličina uzorka od 4 kg odgovara količini od 35 000 sjemenki.
***-U slučaju upakovane hrane za životinje, možda neće biti moguće postići veličinu od 4 kg za zbirni uzorak, zavisno od veličine pojedinačnih jedinica.
****-U slučaju voluminozne hrane ili hrane niske specifične težine (sijeno, slama), zbirni uzorak treba biti najmanje 1 kg.

Dio VI

KOLIČINA KONAČNIH UZORAKA ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE

Za laboratorijsko ispitivanje potrebno je ispitivanje najmanje jednog konačnog uzorka, a količina konačnog uzorka za laboratorijsko ispitivanje ne smije biti manja od:

čvrsta hrana za životinje	500 g (*) (**) (***)
tečna ili polutečna hrana za životinje	500 ml*
* Konačni uzorak za kontrolu prisustva genetski modifikovanog materijala mora da sadrži najmanje 10 000 sjemenki/zrna, a za kukuruz veličina konačnog uzorka mora biti najmanje 3 000 g, a za soju 2 000 g., a za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, pirinač, raž, pšenica i sjeme repe, zbirna veličina uzorka od 500 g odgovara više od 10 000 sjemenki.	
**-Ako je zbirni uzorak znatno manji od 4 kg ili litra može se uzeti i manja količina zbirnog uzorka pod uslovom da se opiše i navede u zapisniku o uzimanju uzoraka.	
***-Pri uzimanju uzoraka mahunarki, zrna žitarica i orašastog voća za određivanje ostataka pesticida, najmanja veličina konačnog uzorka iznosi 1 kg u skladu sa propisom kojim se uređuju metode za uzimanje uzoraka za službenu kontrolu ostataka pesticida u i na proizvodima biljnog i životinjskog porijekla.	

Dio VII

METODE UZIMANJA UZORAKA VELIKIH SERIJA ILI SERIJA KOJE SE SKLADIŠTE ILI PREVOZE NA NAČIN DA UZORKOVANJE U ČITAVOJ SERIJI NIJE MOGUĆE

Ako način prevoza ili skladištenja serije onemogućava uzimanje pojedinačnih uzoraka u čitavoj seriji, uzimanje uzoraka tih serija vrši se kada je serija u protoku.

Kod velikih skladišta namijenjenih skladištenju hrane za životinje, treba da bude ugrađena oprema u skladištu koja omogućava automatsko uzimanje uzoraka u čitavoj skladišnoj seriji.

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

Uzimanje uzoraka velikih serija u brodovima sprovodi se po mogućnosti dok je proizvod u protoku (dinamičko uzorkovanje) na sljedeći način: uzimanje uzoraka se vrši u brodskom skladištu.

Brodsko skladište djelimično se prazni jedno za drugim tako da početno fizičko odvajanje više ne postoji nakon prenosa u skladišnim objektima, a uzimanje uzoraka se može sprovesti na početnom fizičkom razdvajanju ili na razdvajanju nakon prenosa u skladišne objekte.

Istovar broda može trajati nekoliko dana, a uzimanje uzoraka mora sprovesti u redovnim intervalima tokom trajanja istovara, a ako nije moguće uzimanje uzoraka tokom čitavog trajanja istovara, uzorci se uzimaju za dio (uzorkovani dio) čitave serije.

Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

Uzimanje uzoraka automatski vrši se u prisustvu inspektora za bezbjednost hrane.

Ukoliko se automatsko uzimanje uzoraka sprovodi sa unaprijed određenim parametrima koji se ne mogu mijenjati tokom uzimanja uzoraka, a pojedinačni uzorci se skupljaju u zapečaćeni prijemni rezervoar čime se sprječava svaka moguća zloupotreba, uzimanje uzoraka vrši se u prisustvu inspektora za bezbjednost hrane vrši se na početku uzimanja uzoraka, pri svakoj promjeni prijemnog rezervoara za uzorak i na kraju uzimanja uzoraka.

Dio VIII

Statičko uzimanje uzoraka serija koje se prevoze brodom

Ako se uzimanje uzoraka vrši statičkim uzorkovanjem, primjenjuje se postupak za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa sa gornje strane u skladu sa tačkom 1.1 dijela IX ovog priloga.

Uzimanje uzoraka se mora sprovesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/brodskog skladišta, a broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava propisane zahtjeve, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

Dio IX

Uzimanje uzoraka velikih serija koje se skladište u skladištima

Uzimanje uzoraka se mora sprovesti na pristupačnom dijelu serije, a broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimajući u obzir veličinu uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima smatra se da sva hrana za životinje iz te serije takođe ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

Dio X

Uzimanje uzoraka iz skladišnih objekata (silosa)

1. Uzimanje uzoraka iz silosa kojima se (jednostavno) pristupa odozgo

1.1. Uzimanje uzoraka se mora sprovesti na pristupačnom dijelu serije, a broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije takođe ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

2. Uzimanje uzoraka iz silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)

2.1. U silosima kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine >100 tona hrana za životinje se ne može uzorkovati na statički način.

Ako se hrana za životinje u silosu mora uzorkovati i ne postoji mogućnost premještanja pošiljke, lice koje upravlja silosom treba da obizbiji inspektora kada će se silos istovariti kako bi se omogućilo uzimanje uzoraka u trenutku kada je hrana za životinje u protoku.

2.2 Silos kojem se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine <100 tona, uzimanje uzoraka uključuje ispuštanje u prijemni rezervoar količine od 50 do 100 kg i uzimanje uzorka iz njega.

Veličina zbirnog uzorka odgovara čitavoj seriji, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu iz silosa puštenu u prijemni rezervoar za uzimanje uzoraka. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije takođe ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

Uzimanje uzoraka hrane za životinje u rasutom stanju u zatvorenim posudama

Serije hrane za životinje u rasutom stanju mogu se uzorkovati samo nakon istovara, a ako nije moguće obaviti istovar na mjestu utovara ili kontrole uzorci se uzimaju uzoraka obavlja pri istovaru tih posuda.

Dio XI

NAČIN UZIMANJA, PRIPREMANJA I PAKOVANJA UZORAKA

1. Način uzimanja pojedinačnih uzoraka

1.1. Uzorci treba da se uzimaju i pripremaju bez nepotrebnog odlaganja uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprječava promjene sastava ili kontaminacija proizvoda, a instrumenti, radne površine i posude za prijem uzoraka treba da budu čisti i suvi.

1.2. Pojedinačni uzorci treba da se uzimaju nasumično iz cijelog uzorka i treba da budu približno jednake veličine.

1.3. Veličina pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 grama ili 25 grama za volimunožnu hranu ili hranu niske specifične težine.

1.4. Ako se uzimanje uzoraka vrši u skladu sa dijelom VI ovog priloga, uzima se manje od 40 pojedinačnih uzoraka, a veličina pojedinačnih uzoraka određuje se prema veličini zbirnog uzorka u skladu sa dijelom IV ovog priloga.

1.5. U slučaju uzimanja uzoraka malih serija pakovane hrane za životinje gdje je prema količinskim zahtjevima potrebno uzeti ograničen broj pojedinačnih uzoraka, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kg ili jedan litar.

1.6. U slučaju uzimanja uzoraka pakovane hrane za životinje sastavljene od malih jedinica (npr. < 250 g), veličina pojedinačnog uzorka zavisi od veličine jedinice.

1.7. U slučaju uzoraka iz prodaje na daljinu veličina pojedinačnog uzorka zavisi od veličine jedinice te u pojedinačnim slučajevima može sadržati manje od 100 g ili 100 ml.

2. Način uzimanja uzoraka hrane za životinje u rasutom stanju

Uzimanje uzoraka vrši se pri premještanju uzorka (pri utovaru ili istovaru), prema potrebi.

3. Način uzimanja uzoraka pakovane hrane za životinje

Uzorci pakovane hrane za životinje uzimaju se sondom ili lopaticom u skladu sa dijelom III ovog priloga, a uzorci se mogu uzeti nakon odvojenog pražnjenja jedinica, prema potrebi.

4. Način uzimanja uzoraka homogene ili tečne ili polutečne hrane za životinje pogodne za homogenizaciju

Uzorci homogene tečne ili polutečne hrane za životinje uzimaju se u skladu sa dijelom III ovog priloga, a njihov sadržaj se prema potrebi homogenizuje i iz svake se jedinice uzima određena količina.

Pojedinačni uzorci se mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja rezervoara.

5. Način uzimanja uzoraka tečne ili polutečne hrane za životinje koja nije pogodna za homogenizaciju

5.1. Uzorci tečne ili polutečne hrane za životinje koja nije pogodna za homogenizaciju uzimaju se u skladu sa dijelom III ovog priloga, a uzorci se uzimaju sa različitih nivoa.

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

U slučaju iz tač. 5.1 i 5.2 ovog dijela ukupna zapremina uzetih uzorak ne može biti manja od deset litara.

6. Način uzimanja uzoraka krmnih blokova ili kamene soli za lizanje

6.1 Uzorci krmnih blokova ili kamene soli za lizanje uzimaju se u skladu sa dijelom III ovog priloga, a uzorak se može se uzeti kao dio svakog bloka ili kamene soli za lizanje, a u slučaju sumnje da blok ili kamena so za lizanje nije pogodan za homogenizaciju, čitav blok ili kamena so za lizanje može se uzeti kao uzorak.

6.2 Za četiri bloka ili kamene soli za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jedne kamene soli za lizanje.

7. Priprema zbirnih uzoraka

Pojedinačni uzorci miješaju se tako da stvore zbirni uzorak.

8. Priprema konačnih uzoraka

Zbirni uzorak treba da se pažljivo izmiješa.¹

Priprema konačnih uzoraka vrši se na sljedeći način:

- uzorak se čuva u pogodnoj posudi/prijemnom rezervoaru, uz preduzimanje mjera opreza kako bi se tokom prevoza ili skladištenja spriječila promjena sastava uzorka ili kontaminacija.

- u slučaju kontrole materijala ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, zbirni uzorak može se reprezentativno smanjiti na najmanje 2,0 kg ili 2,0 litra (redukovani uzorak)², po mogućnosti mehaničkim ili automatskim distributerom. Za kontrolu prisustva ostataka pesticida u mahunarkama, zrnima žitarica i orašastom voću, najmanja veličina redukovanog uzorka iznosi 3 kg, a ako svojstva hrane za životinje ne dozvoljavaju korišćenje distributera ili distributer nije dostupan, uzorak se smanjuje dijeljenjem na četiri dijela, a iz smanjenih uzoraka pripremaju se konačni uzorci (za potrebe kontrole, službenog postupka i u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu sa dijelom V ovog priloga, a u slučaju kontrole proizvoda, uključujući genetski modificovani materijal ili materijala koje su neravnomjerno raspoređene u hrani za životinje, zbirni uzorak je:

- potpuno homogenizovan i naknadno podjeljen u konačne uzorke približno jednake veličine u skladu sa dijelom V ovog priloga ili

- redukovan na najmanje 2 kg ili 2 litra³ mehaničkim ili automatskim distributerom.

U slučaju kada svojstva hrane za životinje onemogućavaju korišćenje distributera, uzorak se može po potrebi smanjiti dijeljenjem na četiri dijela.

Za kontrolu prisustva genetski modificovanog materijala redukovani uzorak mora sadržati najmanje 35000 sjemenki/zrna kako bi se omogućilo dobijanje konačnih uzoraka za potrebe ispitivanja, a u slučaju referentnog uzorka od najmanje 10000 sjemenki zrna u skladu sa dijelom IV i V ovog priloga.

9. Pakovanje uzoraka

Posude ili pakovanja uzoraka treba da su zapečaćeni i označeni tako da ih nije moguće otvoriti bez oštećenja pečata, koji zahvata cijelu etiketu.

Uzorak se može upakovati i u posudu koja se može zatvoriti tako da je nije moguće otvoriti bez nepovratnog oštećenja posude ili posude, čime se sprječava ponovna upotreba posude.

10. Slanje uzoraka u laboratoriju

Uzorak se bez odlaganja šalju u laboratoriju, zajedno sa podacima.

11. Podaci o uzimanju uzoraka

O svakom uzorku moraju se voditi evidencije kako bi se svaki uzorkovani dio i njegova veličina mogla nedvosmisleno prepoznati.

U evidencijama se unosi svako odstupanje od postupka uzimanja uzoraka.

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

12. Uzorak iz prodaje na daljinu

U slučaju prodaje na daljinu od subjekta u poslovanju s hranom za životinje zahtijeva se dostava uzorka sredstvima komuniciranja na daljinu, kada se nadležno tijelo ne mora subjektu u poslovanju s hranom za životinje predstavljati pod svojim službenim identitetom već može koristiti tajni identitet.

Odmah nakon prijema pošiljke zbirni uzorak i konačni uzorci prodaje na daljinu uzimaju za to ovlašćena lica .

Za dobijanje grupnog uzorka treba iz ukupno dobijene količine nasumice i ravnomjerno raspodijeliti i uzeti odgovarajući broj pojedinačnih uzoraka te ih pažljivo pomiješati/homogenizovati u što je moguće većoj mjeri .

- U slučajevima kada je hrana za životinje pakovana u pojedinačne jedinice mora se iz najmanje četiri jedinice uzeti najmanje jedan pojedinačni uzorak:
- Ukoliko se utvrdi da pribavljene jedinice dolaze iz različitih serija, broj jedinica za uzorkovanje treba smanjiti i ograničiti na jedinice koje su iz iste serije. Ako se u uzorku iz prodaje na daljinu analiziraju sastojci ili materije koji su neravnomjerno raspodijeljeni u hrani za životinje, broj pojedinačnih uzoraka mora biti najmanje 2,5 puta veći nego za uzorke u kojima se analiziraju materije koje su ravnomjerno raspodijeljene u hrani za životinje.
- Iz grupnog uzorka se zatim uzimaju odgovarajući konačni uzorci (za potrebe kontrole i žalbenog postupka i eventualno u referentne svrhe) u skladu tčkom 8 ovog dijela., a u evidenciji o uzorkovanju navodi se da je riječ o uzorku iz prodaje na daljinu. Nadležno tijelo o uzorkovanju odmah obavještava subjekt u poslovanju s hranom za životinje, pri čemu se subjekt u poslovanju s hranom za životinje obavještava i da nadležno tijelo jedan uzorak, drži na raspolaganju subjektu u poslovanju hranom za životinje na određenom mjestu za potrebe žalbenog postupka ili da ga je poslalo subjektu u poslovanju s hranom za životinje ili laboratoriju koju je odredio subjekt u poslovanju s hranom za životinje u skladu sa važećim nacionalnim propisima.

Pri direktnom slanju uzorka u službenu laboratoriju, konačni uzorak moraju pripremiti i zapečatiti u laboratoriji osobe ovlašćene za tu svrhu ili se uzorci moraju pripremiti i zapečatiti u prisustvu tih osoba. Evidencija o uzorkovanju uzorka iz prodaje na daljinu mora se odmah nakon dobijanja konačnih uzoraka poslati nadležnom tijelu, koje o uzorkovanju obavještava subjekt u poslovanju s hranom za životinje.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje iste klase ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava propisane zahtjeve, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da ostatak serije ispunjava propisane zahtjeve.

¹ Sve grudvice se razbiju (prema potrebi, tako da se odvoje i zatim vrate u uzorak).

² Osim u slučaju krmnog bilja i hranu za životinje sa malom specifičnom težinom.

³ Osim u slučaju krmnog bilja i hranu za životinje sa malom specifičnom težinom.

ANALITIČKE METODE ZA PRIPREMU UZORAKA HRANE ZA ŽIVOTINJE ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE

Dio I

ANALITIČKE METODE ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE

1. Priprema uzoraka za laboratorijsko ispitivanje

Uzorci za analizu koji se šalju kontrolnim laboratorijima nakon uzorkovanja moraju biti u skladu s odredbama Priloga 1. Priprema uzoraka hrane za životinje koji se šalju u laboratoriju za ispitivanje vrši se na način da izmjerene količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke, kako zahtjevaju analitičke metode.

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

2. Mjere opreza

Postupak pripremanja uzoraka vrši se u zavisnosti od analitičkih metoda koje će se koristiti, kao i proizvoda i materijala koji se kontrolišu. Način pripreme uzoraka treba da bude odgovarajući u odnosu na analitičku metodu koja se primjenjuje kao i proizvodima i materijalima koji se ispituju. Potrebni postupci treba da se sprovedu na način kojim se u najvećoj mogućoj mjeri sprječava kontaminacija i promjena sastava uzorka. Mljevenje, miješanje i prosijavanje treba da se vrši bez odlaganja kako bi se uzorak što kraće izlagao vazduhu i svijetlot i ne mogu se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak.

Ako je hrana za životinje osjetljiva na toplotu, uzorci treba da se ručno melju, a oprema ne smije da bude izvor kontaminacije. U nekim slučajevima homogenizacija uzorka pripremom suspenzije miješanjem s visokom smicanjem s vodom daje homogenije poduzorke od suve homogenizacije/mljevenja, posebno ako je riječ o heterogeno raspodijeljenim hemijskim materijama. Homogenizacijom suvim mljevenjem u dovoljnom trajanju mogu se dobiti homogeni poduzorci. U nekim slučajevima, pri određivanju štetnih botaničkih nečistoća uzorak se ne može homogenizirati mljevenjem, već dovoljnim miješanjem uzorka.

Ako se priprema ne može obaviti bez znatne promjene sadržaja vlage u uzorku, sadržaj vlage se određuje prije i nakon pripreme, u skladu sa dijelom I priloga 3 ovog pravilnika.

3. Postupak**3.1 Opšti postupci**

Dio uzorka za analizu uzima se iz konačnog homogenizovanog uzorka i ne preporučuje se dijeljenje uzoraka metodom raspoređivanja u oblik kruga ili kupe i njegovo dijeljenje na četiri dijela po dijagonali, jer se na taj način mogu dobiti dijelovi uzorka za analizu sa velikom greškom dijeljenja.

3.1.1 Hrana za životinje koja se može samljati bez dodatne obrade

Prosijani konačni uzorak se promiješa i prikupi u odgovarajuću čistu i suhu posudu sa hermetičkim zatvaračem, a neposredno prije mjerenja količine uzorka za analizu, uzorak se ponovo promiješa kako bi se obezbjedila potpuna homogenizacija.

3.1.2 Hrana za životinje koja se može samljati nakon sušenja

Ako analitičke metode ne propisuju drugačije, konačni uzorak se, u skladu sa tačkom 4.3. dijela I priloga 3 ovog pravilnika, suši tako da se sadržaj vlage snizi na 8%–12%, a zatim se nastavlja u skladu sa tačkom 3.1.1. ovog dijela.

3.1.3 Tačna ili polutečna hrana za životinje

Konačni uzorak se sakuplja u odgovarajuću čistu i suhu posudu sa hermetičkim zatvaračem, a neposredno prije mjerenja količine uzorka za analizu, uzorak se dobro promiješa kako bi se obezbjedila potpuna homogenizacija.

3.1.4 Ostala hrana za životinje

Konačni uzorci koji se ne mogu pripremiti u skladu sa tač. 3.1.1, 3.1.2 i 3.1.3 ovog dijela obrađuju se bilo kojim drugim postupkom kojim se obezbjeđuje da je izmjerena količina uzorka za analizu homogena i reprezentativna za konačne uzorke.

3.2 Posebni postupak pri provjeri vizuelnom kontrolom ili mikroskopijom ili kada je čitav zbirni uzorak homogen

U slučaju provjere vizuelnom kontrolom (bez korišćenja mikroskopa), za provjeru se koristi čitav laboratorijski uzorak.

U slučaju mikroskopske provjere, u laboratoriji se može smanjiti zbirni uzorak ili dodatno smanjiti redukovani uzorak. Konačni uzorci za referentne uzorke uzimaju se na identičan način kao konačni uzorci u postupku kontrole.

Ako je čitav zbirni uzorak homogen, konačni uzorci uzimaju se iz homogenog zbirnog uzorka.

Za određivanje ražene glavice i štetnih botaničkih nečistoća konačni uzorak se mora podijeliti u dva poduzorka jednake mase od približno 500 grama. Ispituje se jedan poduzorak. Ako je rezultat poduzoraka jednak ili manji od 50 % (analitički prag) najveće dozvoljene količine, uzorak je u skladu s najvećom dozvoljenom količinom. Ako je rezultat veći od 50 % najveće dozvoljene količine, treba ispitati drugi poduzorak i za provjeru usklađenosti s najvećom dozvoljenom količinom upotrijebiti prosjek rezultata dva poduzorka.

4. Čuvanje uzoraka

Uzorci treba da se čuvaju na temperaturi koja neće promijeniti njihov sastav, a uzorci namijenjeni za analizu vitamina ili materija posebno osjetljivih na svjetlost treba da se čuvaju u uslovima u kojima uzorak nije pod štetnim uticajem svjetlosti.

Dio II

REAGENSI I OPREMA KOJA SE KORISTI U ANALITIČKIM METODAMA

1. Ako se u analitičkim metodama ne navodi drugačije, svi reagensi koji se koriste u analitičkim metodama treba da budu analitičke čistoće (*pro analisi* (p.a.)), a čistoća reagensa treba da se provjeri slijepom probom. U zavisnosti od dobijenih rezultata, može biti potrebno dodatno prečišćavanje reagensa.

2. Prilikom primjene analitičkih metoda koje uključuju pripremanje rastvora, razblaživanje, ispiranje ili pranje, a kod kojih se ne navodi vrsta korišćenog rastvora ili rastvarača, koristi se voda, koja je demineralizovana ili destilovana. U posebnim slučajevima, navedenim u analitičkim metodama, vodu treba pročititi posebnim postupcima.

3. S obzirom na opremu koja se uobičajeno nalazi u kontrolnim laboratorijima, u analitičkim metodama se navode samo posebni instrumenti i oprema ili oni koji zahtijevaju poseban način uporabe. Oprema i instrumenti koji se koriste za laboratorijsko ispitivanje treba da budu čisti, posebno kod određivanja vrlo malih količina materija.

Dio III

PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA

1. Postupak ekstrakcije

Nekoliko metoda utvrđuje poseban postupak ekstrakcije. Osim postupka navedenog u metodi mogu se koristiti i drugi postupci ekstrakcij pod uslovom da je efikasnost korišćenog postupka ekstrakcije za analizirani matriks dokazano istovjetna sa postupkom navedenim u metodi.

2. Postupak prečišćavanja

Nekoliko metoda utvrđuje poseban postupak prečišćavanja. Osim postupka navedenog u metodi mogu se koristiti i drugi postupci prečišćavanja pod uslovom da je efikasnost korišćenog postupka prečišćavanja za analizirani matriks dokazano istovjetna sa postupkom navedenim u metodi.

3. Broj postupaka određivanja

Kod analize nepoželjnih materija, ako je rezultat prvog određivanja znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontroliše, ne sprovode se dodatni postupci određivanja pod uslovom da su korišćeni odgovarajući postupci za obezbjeđivanje kvaliteta.

U drugim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutrašnje ukrštene kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka, a za potvrđivanje usklađenosti koristi se srednja vrijednost dva određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

Pri kontroli najmanjih i najvećih dozvoljenih količina dodataka hrani za životinje, ako su rezultati prvog određivanja viši od najmanje količine ili niži od najveće dozvoljene količine, nisu potrebna dodatna određivanja pod uslovom da su korišteni odgovarajući postupci za obezbjeđenje kvaliteta. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (drugo određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutrašnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za dalju procjenu koristi se srednja vrijednost dva određivanja.

Prilikom kontrole deklaracije dodataka hrani za životinje, ako se rezultatom prvog određivanja potvrdi označeni sadržaj, odnosno ako je rezultat analize unutar prihvatljivih granica odstupanja od označenog sadržaja, ne sprovode se dodatni postupci određivanja pod uslovom da su korišteni odgovarajući postupci za obezbjeđivanje kvaliteta.

U drugim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutrašnje ukrštene kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka, a za potvrđivanje usklađenosti koristi se srednja vrijednost dva određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

4. Izvještaj o korišćenoj analitičkoj metodi

U izvještaju o analizi hrane za životinje navodi se i korišćena analitička metoda.

5. Izvještavanje o rezultatima analize

Rezultat analize prikazuje se na način utvrđen analitičkom metodom, a prema potrebi se koriguje u odnosu na sadržaj vode u konačnom uzorku prije pripreme. Većina vrijednosti o hrani za životinje (npr. najveća dozvoljena količina, najmanja količina) utvrđena je u odnosu na hranu za životinje s učešćem vlage od 12 %. Stoga u tim slučajevima, pri ocjeni rezultata analize izmjenjenog na uzorku u odnosu na propisanu vrijednost, rezultat analize najprije treba podijeliti s učešćem suve materije uzorka (u %) pomnoženo s 88, kako je navedeno u sljedećoj formuli:

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

pri čemu je:

Mc: $\frac{1}{4} 88 \times 100 - Mc$ udio vlage uzorka (u %). $100 - Mc$ predstavlja udio suve materije uzorka (u %).

R_{ana} : rezultat analize izmjeren na uzorku.

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

Osim toga, ako su ispunjeni sljedeći uslovi:

— rezultat analize znatno (> 50 %) je niži ili viši od informacija na oznaci/specifikaciji koje se kontrolišu (zavisno od toga odnose li se informacije na oznaci/specifikaciji na najveću dozvoljenu količinu ili na najmanju količinu);

— učešće vlage uzorkovane hrane za životinje poznat je pa se može utvrditi da korekcija s obzirom na učešće vlage neće promijeniti procjenu, moguće je, pod uslovom da se koriste odgovarajući postupci za obezbjeđenje kvaliteta, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, izostaviti korekciju s obzirom na učešće vlage (npr. ako ne postoji specifikacija ili propisana vrijednost), osim ako je to potrebno radi tumačenja. Ako se rezultat analize koriguje s obzirom na učešće vlage, u istom postupku treba korigovati i odgovarajuću mjernu nesigurnost.

U slučaju određivanja ražene glavice ili štetnih botaničkih nečistoća vizuelnim/mikroskopskim pregledom nije potrebna korekcija s obzirom na učešće vlage

6. Nesigurnost mjerenja i stepen iskorišćenja pri analizi nepoželjnih materija

Ukoliko se analizom utvrdi da hrana za životinje sadrži nepoželjne materije koje prelaze dozvoljenu količinu, a ako je rezultat analize, u odnosu na hranu za životinje sa sadržajem vlage od 12 %, veći od maksimalno dozvoljene količine, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost upotrebom faktora pokrivanja 2, čime se postiže nivo pouzdanosti od približno 95% i korekciju za iskorišćenje, a za ocjenu usklađenosti koristi se analizirana koncentracija nakon korekcije za iskorišćenje i nakon oduzimanja proširene nesigurnosti mjerenja u slučajevima kada analitička metoda omogućava procjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorišćenje (na pr. nije moguće u slučaju mikroskopske analize).

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

Rezultati analize iskazuju se na sljedeći način (ako korišćena analitička metoda omogućuje ocjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorišćenje):

(a) sa korekcijom za iskorišćenje, pri čemu se navodi nivo iskorišćenja, a korekcija za iskorišćenje nije potrebna ako je postotak iskorišćenja između 90% i 110%.

(b) kao „ $x \pm U$ ”, pri čemu je x rezultat analize, U proširena nesigurnost mjerenja uz upotrebu faktora pokrivenosti 2, čime se postiže nivo pouzdanosti od približno 95%.

Ako je rezultat analize znatno ($> 50\%$) niži od specifikacije koja se kontroliše i pod uslovom da su korišćeni odgovarajući postupci za obezbjeđenje kvaliteta, rezultat analize može se prikazati bez korekcije za iskorišćenje s tim što se korekcija za iskorišćenje i nesigurnost mjerenja mogu izostaviti.

7. Nesigurnost mjerenja i stepen iskorišćenja pri analizi nepoželjnih materija

Za provjeru usklađenosti s odobrenim najmanjim i najvećim dozvoljenim količinama dodataka hrani za životinje, prisutnost dodatka hrani za životinje smatra se neusklađenim s utvrđenom najmanjom i najvećom dozvoljenom količinom ako se za rezultat analize, kao srednju vrijednost dva nezavisna određivanja, u odnosu na hranu za životinje s učešćem vlage od 12 % smatra:

— da prelazi najveću dozvoljenu količinu, uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost analize i korekciju za iskorišćenje. To znači da se za ocjenu usklađenosti koristi analizirana koncentracija (tj. srednja vrijednost dva određivanja) nakon korekcije za iskorišćenje i nakon oduzimanja proširene mjerne nesigurnosti analize.

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

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

Rezultat analize iskazuje se na sljedeći način (ako korišćena analitička metoda omogućava procjenu proširene mjerne nesigurnosti analize):

(a) korigovani za iskorišćenje, ako je to primjereno i relevantno, a ako su korigovani, to treba navesti. Treba navesti stepen iskorišćenja, osim ako je intrinzična korekcija za mjerno odstupanje sastavni dio postupka, pri čemu je odstupanje razlika između izmjerene vrijednosti i referentne koncentracije. Korekcija za iskorišćenje nije potrebna ako je procenat iskorišćenja između 90 % i 110 %;

(b) kao „ $x \pm U$ ”, pri čemu je x rezultat analize (srednja vrijednost dvaju određivanja), a U proširena mjerna nesigurnost analize uz upotrebu faktora pokrivenosti 2, čime se postiže nivo pouzdanosti od približno 95 %.”.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU SASTAVA SIROVINA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE I KRMNIH SMJESA

Dio I
ODREĐIVANJE VLAGE**1. Predmet i područje primjene**

Određivanje sadržaja vlage u hrani za životinje vrši se kada hrana za životinje sadrži isparljive materije, poput organskih kiselina, pri čemu treba uzeti u obzir da se pri određivanju vlage obuhvata i znatna količina isparljivih materija.

Analitička metoda za kontrolu sastava sirovina za hranu za životinje i krmnih smjesa ne obuhvata analizu mliječnih proizvoda kao sirovina za hranu za životinje, analizu mineralnih materija i smjesa sastavljenih uglavnom od mineralnih materija, analizu životinjskih i biljnih masti i ulja ili analizu sjemenki uljarica i uljanog voća.

2. Princip

Uzorak hrane za životinje se suši pod određenim uslovima koji se mijenjaju zavisno od vrste hrane za životinje, a gubitak mase utvrđuje se vaganjem, a kod čvrste hrane za životinje sa visokim sadržajem vlage vrši se prethodno sušenje.

3. Oprema koja se koristi za kontrolu sastava sirovina za hranu za životinje

3.1. Drobilica od materijala koji ne apsorbuje vlagu i lako se čisti, omogućava brzo i ravnomjerno drobljenje bez pretjeranog zagrijavanja, u najvećoj mogućoj mjeri sprječava kontakt sa spoljnim vazduhom te ispunjava zahtjeve iz tač. 4.1.1 i 4.1.2 ovog dijela (npr. udarne ili vodom hladene mikrodrobilice, konusni mlinovi sa sklopivim konusima, spore drobilice ili drobilice sa zupčanicima).

3.2. Analitička vaga sa preciznošću do 1 mg.

3.3. Suve posude od nekorodirajućeg metala ili stakla sa poklopcima koji omogućuju hermetičko zatvaranje, radna površina koja omogućava rasprostiranje uzorka za ispitivanje na približno 0,3 g/cm².

3.4. Izotermička sušnica (±2°C) sa električnim zagrijavanjem i adekvatnim provjetravanjem što omogućava brzu regulaciju temperature.¹

3.5. Podesiva električna vakuum sušnica opremljena uljanom pumpom i mehanizmom za dovod vrućeg suvog vazduha ili sredstva za isušivanje (npr. kalcijum oksid).

3.6. Eksikator sa debelom metalnom ili porculanskom perforiranom pločom koja sadrži efikasno sredstvo za sušenje.

4. Postupak

Postupci sušenja treba da se sprovedu odmah po otvaranju pakovanja sa uzorcima, a analiza treba da se izvrši najmanje dvaput zaredom.

4.1. Priprema**4.1.1. Hrana za životinje**

Uzroci hrane za životinje osim žitarica, grube krupice, tečne ili kašasta hrane za životinje i hrane za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti uzimaju se najmanje 50 g uzorka, a prema potrebi se usitni ili podijeli tako da se spriječi promjena udjela vlage.

4.1.2. Žitarice i gruba krupica

Uzima se najmanje 50 g uzorka, a uzorak se samelje tako da najmanje 50% čestica prolazi kroz sito sa otvorima veličine 0,5 mm, a na situ sa okruglim otvorima veličine 1 mm ostane najviše 10% čestica.

4.1.3. Tečna ili kašasta hrana za životinje i hrana za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti

Izmjeri se približno 25 g uzorka sa preciznošću od 10 mg, doda se adekvatna količina bezvodnog pijeska izmjenjenog sa preciznošću od 10 mg i izmiješa dok se ne dobije homogena masa.

4.2. Sušenje

Posuda nekorodirajućeg metala ili stakla sa poklopcem se suši u sušioniku postavljenom na 103 °C 30 min. +/- 1 min. Izvadi se iz sušionika i ohladi se na sobnu temperaturu u eksikatoru (Eksikator sa debelom metalnom ili porculanskom perforiranom pločom koja sadrži efikasno sredstvo za sušenje.).

4.2.1. Hrana za životinje osim žitarica, brašna, grube, sitne krupice i krmnih smjesa

Izmjeri se posuda sa poklopcem sa preciznošću od 1 mg, a u izmjerenu posudu stavi se približno 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi.

Posuda se bez poklopca stavlja u sušnicu prethodno zagrijanu na 103 °C.

Posuda se stavlja u sušnicu što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature, a sušenje traje četiri sata od trenutka kada temperatura u sušnici ponovo dostigne 103° C, a posuda se pokrije poklopcem, izvadi iz sušnice, ostavi da se hladi u eksikatoru (tačka 3.6.) 30 do 45 minuta i izmjeri sa preciznošću od 1 mg.

Hrana za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti suši se u sušnici dodatnih 30 minuta na 130° C, a razlika između dva mjerenja ne treba da bude veća od 0,1 % vlage.

4.2.2. Žitarice, brašno, gruba krupica i sitna krupica

Izmjeri se posuda (tačka 3.3.) sa poklopcem sa preciznošću od 0,5 mg, a u izmjerenu posudu se izmjeri približno 5 g usitnjenog uzorka sa preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi.

Posuda se bez poklopca stavlja u sušnicu prethodno zagrijanu na 130 °C.

Posuda se stavlja u sušnicu što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature, a sušenje traje 2 sata od trenutka kada temperatura u sušnici ponovo dostigne 130 °C.

Posuda se pokrije poklopcem, izvadi iz sušnice, ostavi da se hladi u eksikatoru (tačka 3.6.) 30 do 45 minuta i izmjeri sa preciznošću od 1 mg.

4.2.3. Krmne smješe koje sadrže više od 4% saharaše ili laktoze: sirovine za hranu za životinje poput rogača, hidrolizovanih žitnih proizvoda, sjemenki slada, sušene mljevene repe, ribe i rastvora šećera; krmne smješe koje sadrže više od 25% mineralnih soli, uključujući kristalnu vodu.

Izmjeri se posuda (tačka 3.3.) sa poklopcem sa preciznošću od 0,5 mg, a u izmjerenu posudu se izmjeri približno 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i ravnomjerno raširi. Posuda bez poklopca stavlja se u vakuum sušnicu (tačka 3.5.) prethodno zagrijanu na 80–85° C.

Posuda se stavlja u sušnicu što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature.

Pritisak se poveća na 100 torra i na tom se pritisku ostavi da se suši četiri sata na vrućem suvom vazduhu ili upotrebom sredstva za isušivanje (približno 300 g za 20 uzoraka).

U posljednjem slučaju se vakuum pumpa isključi kad se dostigne traženi pritisak. Vrijeme sušenja računa se od trenutka kada temperatura u sušnici ponovo dostigne 80–85° C.

Oprezno se izjednači pritisak u sušnici sa atmosferskim pritiskom, a sušnica se otvori, posuda se odmah pokrije poklopcem i izvadi iz sušnice, ostavi da se hladi 30 do 45 minuta u eksikatoru (tačka 3.6.) i izmjeri se sa preciznošću od 1 mg.

Suši se dodatnih 30 minuta u vakuum sušnici na 80–85° C i ponovo mjeri, a razlika između dva mjerenja ne može da bude veća od 0,1% vlage.

4.3. Prethodno sušenje

„Mokra“ hrana za životinje s masenim udjelom manjim od 85 % suve materije (npr. krmno bilje, ukupni miješani obroci, (ne)tečna hrana za životinje) mora se prije finog mljevenja djelimično osušiti kako bi se analizirale stabilne materije; za nestabilne materije djelimično sušenje nije moguće.

Djelimično sušenje može se sprovedi u sušioniku s prisilnim strujanjem vazduha ili u mikrotalasnoj rerni ili sušenjem zamrzavanjem. Osim kod djelimičnog sušenja zamrzavanjem, cilj je osušiti hranu za životinje uz održavanje temperature uzorka ispod 60 °C kako bi se što manje uticalo na hemijski sastav.

Sušenje na temperaturama višim od 60 °C uzrokuje hemijske promjene u hrani za životinje (npr. razgradnju bjelancevina). Prije mjerenja djelimične suve materije osušena hrana za životinje se uravnoteži na sobnoj temperaturi približno 15 minuta kako bi se promjena vlage do koje može doći tokom mljevenja i skladištenja smanjila na najmanju moguću mjeru. Sušenjem na temperaturama nižima od 60 °C ne uklanja se sva voda iz hrane za životinje, stoga (početno) djelimično sušenje ne omogućuje utvrđivanje ukupne suve materije u hrani za životinje. Nakon sušenja poduzorak se samelje i analizira se (konačna) suva materija djelimično suvog uzorka (preostala vlaga od 3 % do 15 %) pri određivanju ostalih hemijskih sastojaka.

Preporučuje se postupak određivanja suve materije u dva koraka. Najprije se odredi udio djelimične suve materije (ako je udio suve materije manji od 85 %), zatim se odredi preostali udio suve materije na samljevanom testnom uzorku i djelimična suva materija pomnoži s preostalom suvom materijom kako bi se odredio ukupni udio suve materije.

¹ - Za sušenje žitarica, brašna, grube krupice i sitne krupice sušnica mora imati takav toplotni kapacitet da se nakon postavljanja temperature na 131° C vraća na tu temperaturu za manje od 45 minuta nakon što se u sušnicu postavi maksimalan broj uzoraka za ispitivanje na istovremeno sušenje. Ventilacija mora biti takva da se, u slučaju kada se u sušnici dva sata suši najveći mogući broj uzoraka pšenice, rezultati razlikuju za manje od 0,15% od uzoraka koji su sušeni 4 sata.

5. Izračunavanje rezultata

Sadržaj vlage (X), prikazan kao procentni dio uzorka, izračunava se pomoću sljedeće formule:

5.1. Sušenje bez prethodnog sušenja

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

gdje je:

m - početna masa uzorka u gramima

m_0 - masa suvog uzorka u gramima

5.2. Sušenje sa prethodnim sušenjem

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

gdje je:

m - početna masa uzorka u gramima

m_1 - masa uzorka nakon prethodnog sušenja u gramima,

m_2 - masa uzorka nakon usitnjavanja ili mljevenja

m_0 - masa suvog uzorka u gramima

5.3. Ponovljivost

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

6. Napomena

U slučaju kada je potrebno mljevenje za koje se pokaže da mijenja sadržaj vlage u proizvodu, potrebno je korigovati rezultate analize sastojaka hrane za životinje obzirom na sadržaj vlage u uzorku u početnom stanju.

Dio II

ODREĐIVANJE VLAGE U MASTIMA I ULJIMA ŽIVOTINJSKOG I BILJNOG PORIJEKLA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija u mastima i uljima životinjskog i biljnog porijekla, vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

2. Princip

Uzorak se osuši do konstantne mase (gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne smije da prelazi 1 mg) na 103° C, a gubitak mase utvrđuje se vaganjem.

3. Oprema

3.1. Posuda sa ravnim dnom izrađena od nekorodirajućeg materijala, prečnika 8 do 9 cm i visine približno 3 cm.

3.2. Termometar sa ojačanom kuglicom i ekspanzivnom komorom na gornjem dijelu, baždaren od približno 80 °C do najmanje 110° C i dužine približno 10 cm.

3.3. Pješčano kupatilo ili električna zagrijana ploča

3.4. Eksikator sa efikasnim sredstvom za sušivanje

3.5. Analitička vaga

4. Postupak

Izmjeri se približno 20 g homogenog uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u suhu izmjerenu posudu (tačka 3.1. ovog dijela) u kojoj se nalazi termometar (tačka 3.2. ovog dijela).

Zagrijava se u pješčanom kupatilu ili na grejnoj ploči (tačka 3.3.) uz stalno miješanje termometrom, tako da temperatura dostigne 90 °C u približno sedam minuta.

Smanji se temperatura zagrijavanja i vrši se nadzor učestalosti podizanja mjehurića sa dna posude, a temperatura ne smije preći 105° C, te se nastavi sa miješanjem uz struganje dna posude sve dok ne prestane stvaranje mjehurića.

Radi obezbjeđivanja potpunog uklanjanja vlage, nekoliko puta se zagrije na 103±2° C uz hlađenje na 93° C između uzastopnih zagrijavanja, a zatim se uzorak ostavi da se hladi na sobnoj temperaturi u eksikatoru (tačka 3.4.) ovog dijela i izmjeri, a postupak se ponavlja sve dok gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne bude manji od 2 mg.

Napomena: Povećanje mase uzorka nakon uzastopnog zagrijavanja upućuje na oksidaciju masti, a rezultat se izračunava mjerenjem neposredno prije početka povećavanja mase.

5. Izračunavanje rezultata

Sadržaj vlage (X), prikazan kao procentni dio uzorka, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m - masa testnog uzorka u gramima,

m_1 - masa posude sa sadržajem prije zagrijavanja, u gramima,

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

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

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne treba da prelazi 0,1% apsolutne vrijednosti.

Dio III

ODREĐIVANJE SADRŽAJA AZOTA I SIROVIH PROTEINA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje sadržaja sirovih proteina u hrani za životinje na osnovu sadržaja azota određenog metodom po Kjeldahl-u vrši se sljedećom metodom.

2. Princip

Uzorak se razgradi sumpornom kiselinom u prisustvu katalizatora, a kiseli rastvor se prevede u bazni dodavanjem rastvora natrijum hidroksida, a amonijak se destiluje i sakupi u izmjerenoj količini sumporne kiseline, a višak se titruje standardnim rastvorom natrijum hidroksida.

Druga je mogućnost destilacija oslobođenog amonijaka u višku rastvora borne kiseline, nakon čega slijedi titracija rastvorom hlorovodonične ili sumporne kiseline.

3. Reagensi

- 3.1. Kalijum sulfat.
- 3.2. Katalizator: bakar(II)-oksid CuO ili bakar(II) sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- 3.3. Cink u granulama.
- 3.4. Sumporna kiselina, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3.5. Sumporna kiselina, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.6. Sumporna kiselina, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.7. Sumporna kiselina, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
- 3.8. Indikator metil crveno: rastvori se 300 mg metil crvenog u 100 ml etanola, $\sigma = 95\text{--}96\%$ (v/v).
- 3.9. Rastvor natrijum hidroksida (moguća upotreba tehničke čistoće) $\beta = 40 \text{ g/100 ml}$ (m/v: 40 %).
- 3.10. Natrijum hidroksid, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
- 3.11. Natrijum hidroksid, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
- 3.12. Plovućac u zrnu, ispran u hlavodničnoj kiselini i kalcifikovan.
- 3.13. Acetanilid (temperatura topljenja $= 114^\circ \text{C}$, udio N $= 10,36\%$).
- 3.14. Saharoza (bez azota).
- 3.15. Borna kiselina (H_3BO_3).

- 3.16. Rastvor indikatora metil crveno: rastvori se 100 mg metil crvenog u 100 ml etanola ili metanola.
- 3.17. Rastvor bromkrezol zelenog: rastvori se 100 mg bromkrezol zelenog u 100 ml etanola ili metanola.
- 3.18. Rastvor borne kiseline (10–40 g/l, zavisno od opreme koja se koristi).

Metodom kolorimetrijskog određivanja tačke ekvivalencije, rastvorima borne kiseline treba da se dodaju indikatori metil crveno i bromkrezol zeleno.

Kod pripreme 1 litra rastvora borne kiseline, prije prilagođavanja zapremine, doda se 7 ml rastvora indikatora metil crvenog (tačka 3.16. ovog dijela) i 10 ml rastvor abromkrezol zelenog (tačka 3.17. ovog dijela).

Zavisno od vode koja se koristi, pH vrijednost rastvora borne kiseline može se razlikovati od serije do serije, a za dobijanje pozitivne slijepe probe često treba izvesti prilagođavanje malim volumenom alkalija.

Napomena: Obično je dovoljno dodati 3 do 4 ml NaOH (tačka 3.11. ovog dijela) u 1 litar borne kiseline 10 g/l, a rastvor se čuva na sobnoj temperaturi i zaštićen od svjetlosti i para amonijaka.

- 3.19. Hlorovodonična kiselina, standardni volumetrijski rastvor, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Napomena: Mogu se koristiti i druge koncentracije volumetrijskih rastvora (tačka 3.5., 3.6., 3.7., 3.10., 3.11. i 3.19. ovog dijela), ako se to uzima u obzir u obračunima, a koncentracije se uvijek navode sa četiri decimalna mjesta.

4. Oprema

Uređaj za izvođenje postupaka mineralizacije, destilacije i titracije prema metodi po Kjeldahl-u.

5. Postupak

5.1. Razgradnja

Izmjeri se 1 g uzorka sa preciznošću od 0,001 g i prenese u kivetu aparata za mineralizaciju, doda se 15 g kalijum sulfata (tačka 3.1.), odgovarajuća količina katalizatora (tačka 3.2.) (0,3–0,4 g bakar(II)-oksida ili 0,9–1,2 g bakar(II) sulfat pentahidrata), 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.4.), prema potrebi nekoliko zrna plovućca (tačka 3.12.) i promiješa.

Kiveta se prvo umjereno zagrijava i prema potrebi povremeno protrese, sve dok masa potpuno ne pocrni i nestane pjena, zatim se jače zagrijava do ravnomjernog vrenja tečnosti, a zagrijavanje je odgovarajuće ako se vrela kiselina kondenzuje na zidovima kive i treba spriječiti pregrijavanje zidova i prijanjanje organskih čestica na njih.

Kada se rastvor razbistri i postane svijetlozelen, ostavi se da ključa još 2 sata, a zatim se ostavi da se ohladi.

5.2. Destilacija

Oprezno se doda dovoljna količina vode kako bi se sulfati potpuno rastvorili i ostavi se da se ohladi i prema potrebi doda nekoliko granula cinka (tačka 3.3.), destilacija se nastavlja u skladu sa tač. 5.2.1. ili 5.2.2. ovog dijela.

5.2.1. Destilacija u sumpornoj kiselini

U posudu za prikupljanje aparata za destilaciju doda se tačno izmjerena količina od 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.5.) ili (tačka 3.7.) zavisno o pretpostavljenom udjelu azota i doda se nekoliko kapi indikatora metil crvenog (tačka 3.8.).

Kiveta za mineralizaciju priključi se na kondenzator aparata za destilaciju i vrh kondenzatora uroni u tečnost u tikvici za prikupljanje, najmanje do dubine od 1 cm.

U tikvicu za mineralizaciju polako se ulije 100 ml rastvora natrijum hidroksida (tačka 3.9.) bez gubitka amonijaka i tikvica se zagrijava do potpune destilacije amonijaka.

5.2.2. Destilacija u bornoj kiselini

Kod ručne titracije amonijaka iz destilata koristi se dolje navedeni postupak. Kod destilacionih jedinica koje su u potpunosti automatske i obuhvataju titraciju amonijaka iz destilata, postupa se prema uputstvima proizvođača za rukovanje destilacionom jedinicom.

Tikvica za prikupljanje sa 25–30 ml rastvora borne kiseline (tačka 3.18.) postavi se ispod izlaznog otvora kondenzatora tako da ispusna cijev bude ispod površine viška rastvora borne kiseline.

Destilaciona jedinica se namjesti tako da isporučuje 50 ml rastvora natrijum hidroksida (tačka 3.9.).

Destilacionom jedinicom se rukuje u skladu sa uputstvima proizvođača, a oslobojeni amonijak se destiluje dodavanjem rastvora natrijum hidroksida.

Destilat se prikupi u rastvoru borne kiseline, a količina destilata (vrijeme destilacije parom) zavisi od količine azota u uzorku (pridržavati se uputstva proizvođača).

Napomena: U poluautomatskoj destilacionoj jedinici dodavanje viška natrijum hidroksida i destilacija parom su automatski procesi.

5.3. Titracija

Titracija se vrši u skladu sa tač. 5.3.1. ili 5.3.2. ovog dijela.

5.3.1. Sumporna kiselina

Višak sumporne kiseline titruje se u posudi za prikupljanje do tačke ekvivalencije rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.10. ili 3.11.), u zavisnosti od koncentracije korišćene sumporne kiseline.

5.3.2. Borna kiselina

Sadržaj posude za prikupljanje titruje se standardnim volumetrijskim rastvorom hlorovodonične kiseline (tačka 3.19.) ili standardnim volumetrijskim rastvorom sumporne kiseline (tačka 3.6.), pri čemu se koristi bireta i očitava se količina upotrijebljenog titranta.

Kod metode kolorimetrijskog određivanja tačke ekvivalencije, tačka ekvivalencije se dostiže kod prve pojave ružičastog obojenja sadržaja i očitava se zapremina birete sa preciznošću od 0,05 ml.

Za pomoć kod uočavanja tačke ekvivalencije mogu se koristiti magnetna mješalica sa osvjetljenjem ili fotometrijski detektor.

Postupak kolorimetrijskog određivanja tačke ekvivalencije može se izvesti automatski upotrebom pare sa automatskom titracijom.

Kod rukovanja određenim tipom destilatora ili destilatora/titratora treba se pridržavati uputstva proizvođača.

Napomena:

a) kod automatskog sistema titracije, titracija započinje odmah po početku destilacije, a koristi se rastvor borne kiseline 1% (tačka 3.18.).

b) kod potpuno automatske destilacione jedinice, postupak automatske titracije amonijaka može se izvoditi i određivanjem tačke ekvivalencije metodom potencijometrijske titracije pH.

c) kod potpuno automatske destilacione jedinice koristi se automatski titrator sa pH-metrom, a pravilna kalibracija pH metra izvodi se u području vrijednosti pH 4 do pH 7 uobičajenim laboratorijskim postupcima za kalibraciju pH-metra.

d) tačka ekvivalencije pH titracije dostiže se pri pH 4,6, kada je nagib titracione krive najviši (tačka infleksije).

5.4. Slijeпа proba

Kao potvrda da reagensi ne sadrže azot koristi se slijeпа proba (mineralizacija, destilacija i titracija), u kojoj se umjesto uzorka koristi 1 g saharoze (tačka 3.14.).

6. Izračunavanje rezultata

Izračunavanje se vrši u skladu sa tač. 6.1. ili 6.2 ovog dijela.

6.1. Izračunavanje za titraciju sumporne kiseline

Sadržaj sirovih proteina, izražen kao maseni procenat, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

V_0 - zapremina (ml) NaOH (tačka 3.10. ili 3.11.) korišćena u slijepoj probi,

V_1 - zapremina (ml) NaOH (tačka 3.10. ili 3.11.) korišćena kod titracije uzorka,

c - koncentracija (mol/l) natrijum hidroksida (tačka 3.10).

m - masa (g) uzorka.

6.2. Izračunavanje za titraciju borne kiseline

6.2.1. Titracija hlorovodoničnom kiselinom

Sadržaj sirovih proteina, izražen kao maseni procenat, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m - masa (g) uzorka,

c - koncentracija (mol/l) standardnog volumetrijskog rastvora,

V_0 - zapremina (ml) hlorovodonične kiseline korišćena u slijepoj probi,

V_1 - zapremina (ml) hlorovodonične kiseline korišćena u uzorkovanom dijelu.

6.2.2. Titracija sa sumpornom kiselinom

Sadržaj sirovih proteina, izražen kao maseni procenat, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m - masa (g) uzorka,

c - koncentracija (mol/l) standardnog volumetrijskog rastvora,

V_0 - zapremina (ml) sumporne kiseline korišćena u slijepoj probi,

V_1 - zapremina (ml) sumporne kiseline korišćena u uzorkovanom dijelu.

7. Provjera metode

7.1. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći:

- 0,4% apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih proteina manji od 20%,
- 2% veće vrijednosti za sadržaj sirovih proteina u rasponu od 20–40%,
- 0,8% apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih proteina veći od 40%.

7.2. Obnovljivost

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

- 1,8 % apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih proteina manji od 20 %,
- 9,0 % veće vrijednosti za sadržaj sirovih proteina u rasponu od 20 – 40 %,
- 3,6 % apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih proteina veći od 40 %.

7.3. Tačnost

Za analizu (razgradnja, destilacija i titracija) na odgovarajućoj količini acetanilida (tačka 3.13.) (npr. 0,2 do 0,3 g) u prisustvu 1 g saharoze (tačka 3.14.); za 1 g acetanilida koristi se 14,80 ml sumporne kiseline (tačka 3.5.). Iskristivost mora iznositi najmanje 99 %.

8. Napomene

8.1. Oprema treba da bude ručna, poluautomatska ili automatska, a ako aparatura zahtijeva prelaz između razgradnje i destilacije, taj se prelaz mora izvesti bez gubitka.

Ako tikvica aparata za destilaciju nije opremljena lijevkom za dokapavanje, natrijum hidroksid se dodaje neposredno prije priključivanja kivete na kondenzator, pri čemu se tečnost uliva polako niz zidove tikvice.

8.2. Ako se sadržaj tikvice stvrdnjava, postupak određivanja započinje se iz početka, ali sa količinom sumporne kiseline (tačka 3.4.) koja je veća od sumporne kiseline date u tački 5.1. ovog dijela.

8.3. Kod proizvoda sa niskim sadržajem azota zapremina sumporne kiseline (tačka 3.7.) koji se dodaje u tikvicu za prikupljanje, prema potrebi se može smanjiti na 10 ili 15 ml, a tikvica dopuniti vodom do 25 ml.

8.4. Kod rutinske analize za određivanje sirovih proteina mogu se koristiti i druge metode analize, iako je metoda po Kjeldahl-u, referentna metoda, za svaki matriks pojedinačno treba dokazati da su rezultati dobijeni zamjenskom metodom (npr. DUMAS) ekvivalentni rezultatima dobijenim referentnom metodom, a u izvještaju o analizi navodi se analitička metoda korišćenu za određivanje sirovih proteina budući da rezultati dobijeni zamjenskom metodom, čak i nakon potvrde ekvivalentnosti, mogu odstupati od rezultata dobijenih referentnom metodom.

DIO IV ODREĐIVANJE UREE

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa uree koja se koristi kao dodatak hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

2. Princip

Uzorak se suspenduje u vodi u prisustvu sredstva za bistenje. Suspenzija se filtrira. Sadržaj uree u filtratu određuje se nakon dodavanja 4-dimetilaminobenzaldehida (4-DMAB) mjerenjem optičke gustine na talasnoj dužini od 420 nm.

3. Reagensi

3.1. Rastvor 4-dimetilaminobenzaldehida: rastori se 1,6 g 4-DMAB u 100 ml etanola 96% i doda 10 ml hlorovodonične kiseline (p_{20} 1,19 g/ml). Taj se reagens može čuvati najviše dvije nedelje.

3.2. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata $Zn(CH_3COO)_2 \cdot xH_2O$ i 3 g glacialne sirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot x3H_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Aktivni ugalj koji ne apsorbuje ureu (treba provjeriti).

3.5. Urea, rastvor 0,1% (m/v).

4. Oprema

4.1. Mješalica (rotaciona): približno 35 do 40 obr/min.

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

4.3. Spektrofotometar

5. Postupak

5.1. Analiza uzorka

Izmjeri se 2 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese sa 1 g aktivnog uglja (tačka 3.4.) u sud zapremine 500 ml i doda se 400 ml vode i 5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.2.), miješa približno 30 sekundi i doda 5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.3.). Miješa se 30 minuta na mješalici.

Dopuni se vodom do oznake, promućka i filtrira.

Uzme se 5 ml prozirnog bezbojnog filtrata i prenese u epruvete sa brušenim čepom, doda se 5 ml rastvora 4-DMAB (tačka 3.1.) i promiješa.

Epruvete se stave u vodeno kupatilo na 20° C (+/- 4 °C), a nakon 15 minuta spektrofotometrom se izmjeri optička gustina rastvora uzorka na 420 nm i rezultat se uporedi sa rastvorom reagensa iz slijepe probe.

5.2. Kalibraciona kriva

Uzme se 1, 2, 4, 5 i 10 ml rastvora uree (tačka 3.5.) i prenese u sudove zapremine 100 ml koji se dopune vodom do oznake. Iz svakog rastvora se odstrani 5 ml, te se u svaki doda 5 ml rastvora 4-DMAB (tačka 3.1.), homogenizuje i izmjeri optička gustina, kako je gore navedeno, u poređenju sa kontrolnim rastvorom koji sadrži 5 ml 4-DMAB i 5 ml vode bez uree.

Pripremi se kalibraciona kriva.

6. Izračunavanje rezultata

Količina uree u uzorku određuju se iz kalibracione krive.

Rezultat se iskazuje u mg uree po kg uzorka.

7. Vrednovanje metode

7.1. Ponovljivost

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

- pri 420 nm
 - 50 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 5 000 mg/kg,
 - 25 % više vrijednosti za udio uree od 5 000 mg/kg do manje od 7 000 mg/kg,
 - 20 % više vrijednosti za udio uree 7 000 mg/kg ili veći;
- pri 435 nm
 - 40 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 5 000 mg/kg,
 - 25 % više vrijednosti za udio uree od 5 000 mg/kg do manje od 9 000 mg/kg,
 - 5 % više vrijednosti za udio uree 9 000 mg/kg ili veći.

7.2. Obnovljivost

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

- pri 420 nm
 - 3 000 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 12 000 mg/kg,
 - 4 500 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio uree od 12 000 mg/kg ili više;
- pri 435
 - 50 % više vrijednosti za udio uree od 3 000 mg/kg do manje od 8 000 mg/kg,
 - 25 % više vrijednosti za udio uree 8 000 mg/kg ili veći

8. Rezultati međulaboratorijske studije

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

Tablica 1: Svojstva efikasnosti metode za ureu izmjerenu pri $\lambda = 420$ nm u svim materijalima

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

Tablica 2: Svojstva efikasnosti metode za ureu izmjerenu pri $\lambda = 435$ nm u svim materijalima

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovce	Goveda	Ovce	Ovce	Goveda
Ciljni maseni udio (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Prosječni maseni udio. (mg kg ⁻¹)	4101	6467	7890	10062	11642
Standardna devijacija obnovljivosti S_R (mg kg ⁻¹)	706	1194	675	745	1378
Standardna devijacija ponovljivosti S_R (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167
Relativna standardna devijacija obnovljivosti RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Relativna standardna devijacija ponovljivosti RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Granica obnovljivosti, R [$R = 2,8 \times S_R$]	1977	3344	1889	2087	3859
Granica ponovljivosti, r [$r = 2,8 \times S_r$]	1596	1759	1715	549	467

9. Napomene

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

Dio VI ODREĐIVANJE AMINOKISJELINA (OSIM TRIPTOFANA)

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

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

Napomena:

Analitička metoda utvrđena u standardu EN 17180 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje aminokiselina u hrani za životinje koja sadrži više od 10 % aminokiselina.

Ta metoda nije validirana u okviru međulaboratorijskog ispitivanja za premikse koji sadrže više od 10 % dodataka hrani za životinje. Međutim, može se upotrebljavati i za te matrice uz odgovarajuće manje izmjene pod uslovom da se interno validira.

1. Predmet i područje primjene

Ova se metoda koristi za određivanje slobodnih (sintetičkih i prirodnih) i ukupnih (vezanih za peptide i slobodnih) aminokiselina u hrani za životinje koji sadrže manje od 10% svake aminokiseline (⁵) pomoću analizatora aminokiselina za sljedeće aminokiseline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

Ovom metodom se ne mogu razlikovati soli aminokiselina niti je moguće utvrditi razliku između oblika D- i L-aminokiselina.

Ova metoda nije primjenljiva za određivanje triptofana ili hidroksi-analoga aminokiselina.

2. Princip

2.1. Slobodne aminokiseline

Slobodne aminokiseline ekstrahuju se razblaženom hlorovodoničnom kiselinom. Koekstrahovani azotni makromolekuli istalože se sulfosalicilnom kiselinom i uklone filtriranjem.

Vrijednost pH filtriranog rastvora podesi se na 2,20.

Aminokiseline se razdvoje jonsko-izmjenjivačkom hromatografijom i odrede reakcijom sa ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm.

2.2. Ukupne aminokiseline

Odabir postupka zavisi od ispitivanih aminokiselinama.

Cist(e)in i metionin se prije hidrolize moraju oksidovati u cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon, a tirozin se mora odrediti u hidrolizatima neoksidovanih uzoraka, a sve druge aminokiseline iz tačke 1 ovog dijela mogu se odrediti u oksidovanom ili neoksidovanom uzorku.

Oksidacija se izvodi na 0° C mješavinom peroksimravlje kiseline i fenola, a višak oksidovanog reagensa razgradi se natrijum disulfitom.

Oksidovani ili neoksidovani uzorak se 23 sata hidrolizuje hlorovodoničnom kiselinom (tačka 3.20.).

Vrijednost pH hidrolizata podesi se na 2,20.

Aminokiseline se razdvoje jonsko-izmjenjivačkom hromatografijom i odrede reakcijom sa ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm (440 nm za prolin).

3. Reagensi

Obvezno se koristi dvostruko destilovana voda ili voda sličnog kvaliteta (provodljivost <10 µS)

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

3.2. Mravlja kiselina, m (m/m) = 98% – 100%.

3.3. Fenol.

3.4. Natrijum disulfit.

3.5. Natrijum hidroksid.

3.6. 5-sulfosalicilna kiselina dihidrat.

3.7. Hlorovodonična kiselina, gustine približno 1,18 g/ml.

3.8. Trinatrijum citrat dihidrat.

3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).

3.10. Natrijum hlorid.

3.11. Ninhidrin.

3.12. Petrol etar, tačka ključanja 40 – 60° C.

3.13. Norleucin ili drugo jedinjenje pogodno za upotrebu kao interni standard

3.14. Gasoviti azot (<10 ppm kiseonika).

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokiseline.

3.16.1. Standardne materije iz tačke 1. Čista jedinjenja koja ne sadrže kristalnu vodu. Prije upotrebe suše se 1 nedjelju pod vakuumom sa P₂O₅ ili H₂SO₄.

3.16.2. Cisteinska kiselina.

3.16.3. Metionin-sulfon.

3.17. Rastvor natrijum hidroksida, c = 7,5 mol/l:

U vodi se rastvori 300 g NaOH (tačka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.18. Rastvor natrijum hidroksida, c = 1 mol/l:

U vodi se rastvori 40 g NaOH (tačka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.19. Mravlja kiselina – rastvor fenola:

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

3.20. Smjesa za hidrolizu, c = 6 mol HCl/l koja sadrži 1 g fenola/l:

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

3.21. Smjesa za ekstrakciju, c = 0,1 mol HCl/l koja sadrži 2% tiodiglikola: 8,2 ml HCl (tačka 3.7.) se razblaži sa približno 900 ml vode, doda se 20 ml tiodiglikola (tačka 3.9.) i dopuni vodom do 1 litra (ne smiju se direktno miješati materije iz tačaka 3.7. i 3.9.).

3.22. 5-sulfosalicilna kiselina, β = 6 %:

U vodi se rastvori 60 g 5-sulfosalicilne kiseline (tačka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.23. Oksidaciona smjesa (peroksimravlja kiselina – fenol):

Izmješa se 0,5 ml vodoničnik peroksida (tačka 3.1.) sa 4,5 ml rastvora mravlje kiseline i fenola (tačka 3.19.) u maloj čaši. Inkubira se 1 sat na 20 – 30 °C kako bi se dobila peroksimravlja kiselina, zatim se ohladi u ledenom vodenom kupatilu (15 min) prije dodavanja u uzorak.

Upozorenje: Izbjegavati dodir sa kožom i nositi zaštitnu odjeću.

3.24. Citratni pufer, c = 0,2 mol Na⁺/l, pH 2,20:

U približno 800 ml vode rastvori se 19,61 g natrijum citrata (tačka 3.8.), 5 ml tiodiglikola (tačka 3.9.), 1 g fenola (tačka 3.3.) i 16,50 ml HCl (tačka 3.7.), vrijednost pH se podesi na 2,20 i dopuni se vodom do 1 litra.

3.25 Puferi za eluiranje, pripremljeni u skladu sa uputstvima za analizator koji se koristi (tačka 4.9.).

3.26 Reagens ninhidrin, pripremljen u skladu sa uputstvima za analizator koji se koristi (tačka 4.9.).

3.27 Standardni rastvor aminokisjelina treba da se drži na temperaturi nižoj od 5° C.

3.27.1. Osnovni standardni rastvor aminokisjelina (tačka 3.16.1.).

c = 2,5 µmol/ml za svaku u hlorovodoničnoj kiselini.

3.27.2. Osnovni standardni rastvor cisteinske kiseline i metionin-sulfona, c = 1,25 µmol/ml.

U sudu zapremine 1 l rastvori se 0,2115 g cisteinske kiseline (tačka 3.16.2.) i 0,2265 g metionin-sulfona (tačka 3.16.3.) u citratnom puferu (tačka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do oznake i može se čuvati najduže 12 mjeseci na temperaturi nižoj od 5° C i ne koristi se ako osnovni standardni rastvor (tačka 3.27.1.) sadrži cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon.

3.27.3. Osnovni standardni rastvor internog standarda, npr. norleucina, c = 20 µmol/ml.

U posudi se rastvori 0,6560 g norleucina (tačka 3.13.) u citratnom puferu (tačka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do 250 ml i može se čuvati najduže šest mjeseci na temperaturi nižoj od 5° C.

3.27.4. Kalibraconi rastvor standardnih aminokisjelina koji se koristi sa hidrolizatima, c = 5 nmol/50 µl za cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon i c = 10 nmol/50 µl za druge aminokiseline.

U čaši zapremine 100 ml rastvori se 2,2 g natrijum hlorida (tačka 3.10.) sa 30 ml citratnog pufera (tačka 3.24.) i doda se 4,00 ml osnovnog standardnog rastvora aminokisjelina (tačka 3.27.1.), 4,00 ml osnovnog standardnog rastvora cisteinske kiseline i metionin-sulfona (tačka 3.27.2.) i 0,50 ml osnovnog rastvora internog standarda (tačka 3.27.3.) ako se isti koristi, vrijednost pH se podesi natrijum hidroksidom na 2,20 (tačka 3.18.).

Sadržaj se kvantitativno prenese u sud zapremine 50 ml, dopuni citratnim puferom (tačka 3.24.) do oznake i promiješa.

Čuva se najduže tri mjeseca na temperaturi nižoj od 5° C.

3.27.5. Pripremi se kalibracioni rastvor standardnih aminokisjelina koji se koristi sa hidrolizatima u skladu sa tačkom 5.3.3.1. ovog dijela, a za ekstrakte u skladu sa tačkom 5.2. ovog dijela, a kalibracioni rastvor se pripremi u skladu sa tačkom 3.27.4. ovog dijela, ali bez natrijum hlorida.

Čuva se najduže 3 mjeseca na temperaturi nižoj od 5° C.

4 Oprema

4.1. Balon sa okruglim dnom zapremine 100 ili 250 ml sa povratnim hlađenjem.

4.2 Staklena posuda od borsilikatnog stakla zapremine 100 ml sa navojnim čepom obloženim gumom/teflonom (npr. Duran, Schott) za upotrebu u sušnici.

4.3 Sušnica sa forsiranom ventilacijom i regulatorom temperature tačnosti veće od ±2°C.

4.4 pH metar (na tri decimalna mjesta).

4.5 Membranski filter (0,22 µm).

4.6 Centrifuga.

4.7 Rotacioni vakuumi uparivač.

4.8 Mehanička mućkalica ili magnetna mješalica.

4.9 Analizator aminokisjelina ili oprema za HPLC sa kolonom za izmjenu jona, aparaturom za ninhidrin i derivatizaciju nakon kolone te fotometrijskim detektorom.

Kolona se napuni smolama sulfoniranog polistirena koje mogu razdvajati aminokiseline jedne od drugih i od drugih materijala koji reaguju na ninhidrin. Tok u puferskoj i ninhidrinskoj liniji obezbjeđuje se pumpama sa protokom stabilnosti ±0,5% u vremenu koje obuhvata izvođenje standardne kalibracije i analizu uzorka.

Kod nekih analizatora aminokisjelina mogu se koristiti postupci hidrolize kod kojih je koncentracija natrijuma u hidrolizatu c = 0,8 mol/l, a hidrolizat sadrži sav ostatak mravlje kiseline iz procesa oksidacije.

Primjenom drugih metoda ne postiže se zadovoljavajuće razdvajanje nekih aminokisjelina ako se u hidrolizatu nalazi višak mravlje kiseline i/ili visoka koncentracija natrijumovih jona, u tom slučaju sadržaj kiseline nakon hidrolize i prije podešavanja pH smanjuje se uparavanjem na približno 5 ml, a uparavanje se vrši pod vakuumom na najviše 40° C.

5 Postupak

5.2 Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine 0,5 mm, a uzorci sa visokim sadržajem vlage moraju se prije mljevenja osušiti na vazduhu na temperaturi koja ne prelazi 50 °C ili smrzavanjem.

Uzorci sa visokim sadržajem masti ekstrahuju se petrol etrom (tačka 3.12.) prije mljevenja.

5.3 Određivanje slobodnih aminokisjelina u hrani za životinje i premiksima

Izmjeri se odgovarajuća količina (1 – 5 g) pripremljenog uzorka (tačka 5.1.) sa preciznošću od 0,2 mg i prenese u erlenmajer, pa se doda 100,0 ml smjese za ekstrakciju (tačka 3.21.).

Smjesa se 60 minuta mucka na mehaničkoj mućkalici ili magnetskoj mješalici (tačka 4.8.) i pričekava da talog padne na dno i pipetom prenese 10,0 ml supernatanta u čašu zapremine 100 ml.

Tokom miješanja doda se 5,0 ml rastvora sulfosalicilne kiseline (tačka 3.22.) i nastavi 5 minuta miješati magnetnom mješalicom.

Supernatant se filtrira ili centrifugira kako bi se uklonio cjelokupni talog.

U čašu zapremine 100 ml izlije se 10,0 ml dobijenog rastvora i vrijednost pH podesi na 2,20 rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.18.), prenese citratnim puferom (tačka 3.24.) u sud odgovarajuće zapremine i dopuni rastvorom pufera (tačka 3.24.) do oznake.

Ako se koristi interni standard, za svakih 100 ml konačnog rastvora doda se 1,00 ml internog standarda (tačka 3.27.3.) i dopuni rastvorom pufera (tačka 3.24.) do oznake.

Nastavlja se sa hromatografijom u skladu sa tačkom 5.4 ovog dijela.

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

5.4 Određivanje ukupnih aminokisjelina

5.4.1. Oksidacija

Izmjeri se 0,1–1 g pripremljenog uzorka (tačka 5.1.) sa preciznošću od 0,2 mg i prenese u:

- balon sa okruglim dnom zapremine 100 ml (tačka 4.1.) za otvorenu hidrolizu (tačka 5.3.2.3.) ili,
- balon sa okruglim dnom zapremine 250 ml (tačka 4.1.) ako se zahtijeva niska koncentracija natrijuma (tačka 5.3.3.1.) ili,
- staklenu bocu sa navojnim čepom zapremine 100 ml (tačka 4.2.) za zatvorenu hidrolizu (tačka 5.3.2.4.).

U izmjerenom dijelu uzorka sadržaj azota mora iznositi približno 10 mg, a sadržaj vlage ne treba da bude veći od 100 mg.

Balon/boca se postavi u ledeno vodeno kupatilo i ohladi na 0 °C, doda se 5 ml oksidacione smjese (tačka 3.23.) i miješa staklenom lopaticom sa zakrivljenim vrhom. Balon/boca sa lopaticom se hermetički zatvori filmom, a ledeno vodeno kupatilo sa hermetički zatvorenom posudom stavi u frižider na 0 °C i ostavi 16 sati.

Nakon 16 sati posuda se izvadi iz frižidera, a višak oksidacionog reagensa se razgradi dodavanjem 0,84 g natrijum disulfita (tačka 3.4.) i nastavlja se postupak u skladu sa tačkom 5.3.2.1 ovog dijela.

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. Hidroliza oksidovanih uzoraka

U oksidovani uzorak, pripremljen u skladu sa tačkom 5.3.1. ovog dijela doda se 25 ml smjese za hidrolizu (tačka 3.20.), pri čemu treba pažljivo ispratiti sve ostatke uzorka sa zidova posude i lopatice i nastavlja se postupak u skladu sa tač. 5.3.2.3. ili 5.3.2.4., u zavisnosti od korišćenom postupku hidrolize.

5.3.2.2. Hidroliza neoksidovanih uzoraka

U balon sa okruglim dnom zapremine 100 ml ili 250 ml (tačka 4.1.) ili u bocu sa navojnim čepom zapremine 100 ml (tačka 4.2.) izmjeri se 0,1–1 g pripremljenog uzorka (tačka 5.1.) sa preciznošću od 0,2 mg, u izmjerenom dijelu uzorka sadržaj azota mora iznositi približno 10 mg i oprezno se doda 25 ml smjese za hidrolizu (tačka 3.20.) i pomiješa sa uzorkom i nastavlja se u skladu sa tač. 5.3.2.3. ili 5.3.2.4 ovog dijela.

5.3.2.3. Otvorena hidroliza

U smjesu koja se nalazi u balonu (pripremljenu u skladu sa tačkom 5.3.2.1. ili 5.3.2.2. ovog dijela) dodaju se tri staklene perle, zatim se ostavi da ključa 23 sata uz stalno vrenje pod refluksom.

Po završetku hidrolize kondenzator se ispere sa 5 ml citratnog pufera (tačka 3.24.), a balon se odvoji i ohladi u ledenom vodenom kupatilu i nastavlja se u skladu sa tačkom 5.3.3. ovog dijela.

5.3.2.4. Zatvorena hidroliza

Boca sa smješom pripremljenom u skladu sa tač. 5.3.2.1. ili 5.3.2.2. ovog dijela postavi se u sušnicu (tačka 4.3.) na temperaturi od 110 °C, kako bi se tokom prvog sata spriječio povećanje pritiska i eksplozija (zbog nastanka gasova), poklopac sa navojem treba postaviti na vrh posude. Posuda se ne smije zatvoriti poklopcem, nakon jednog sata posuda se zatvori poklopcem i ostavi 23 sata u sušnici (tačka 4.3.), a po završetku hidrolize boca se izvadi iz sušnice, oprezno se otvori poklopac boce i boca položi u ledeno vodeno kupatilo i ostavi se da se ohladi. Zavisno od postupka podešavanja pH (tačka 5.3.3.) sadržaj posude se citratnim puferom (tačka 3.24.) kvantitativno prenese u čašu zapremine 250 ml ili balon sa okruglim dnom zapremine 250 ml i nastavlja se postupak u skladu sa tačkom 5.3.3. ovog dijela.

5.3.3. Podešavanje pH

Zavisno od odstupanja analizatora aminokisjelina (tačka 4.9.) za natrijum, podešavanje pH se sprovodi u skladu sa tač. 5.3.3.1. ili 5.3.3.2. ovog dijela.

5.3.3.1. Hromatografski sistemi (tačka 4.9.) koji zahtijevaju nisku koncentraciju natrijuma

Pri upotrebi analizatora aminokisjelina koji zahtijevaju nisku koncentraciju natrijuma (kada treba smanjiti zapreminu kiseline) preporučuje se upotreba rastvora internog osnovnog standarda (tačka 3.27.3.).

U tom slučaju se hidrolizatu prije isparavanja dodaje 2,00 ml rastvora internog osnovnog standarda (tačka 3.27.3.).

U hidrolizat dobijen postupkom u skladu sa tač. 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. ovog dijela dodaju se 2 kapljice 1-oktanola (tačka 3.15.).

Zapremina se smanji na 5–10 ml rotacionim otparivačem (tačka 4.7.) pod vakuumom na 40° C, a ako se zapremina slučajno smanji na manje od 5 ml, hidrolizat se mora odbaciti i ponovo započeti analiza.

Rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.18.) vrijednost pH podesi se na 2,20 i nastavlja u skladu sa tačkom 5.3.4. ovog dijela.

5.3.3.2. Za sve druge analizatore aminokisjelina (tačka 4.9.)

Hidrolizati dobijeni u skladu sa tač. 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. ovog dijela djelimično se neutralizuju opreznim dodavanjem, uz miješanje, 17 ml rastvora natrijum hidroksida (tačka 3.17.), pri čemu se temperatura mora održavati na manje od 40 °C.

Na sobnoj temperaturi podesi se vrijednost pH na 2,20 rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.17.) i zatim rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.18.). Nastavlja se u skladu sa tačkom 5.3.4 ovog dijela.

5.3.4. Rastvor uzorka za hromatografiju

Hidrolizat (tačka 5.3.3.1. ili 5.3.3.2.) sa podešenom vrijednošću pH, citratnim puferom (tačka 3.24.) se kvantitativno prenese u sud zapremine 200 ml i dopuni puferom (tačka 3.24.) do oznake, a ako do tada nije korišćen interni standard, doda se 2,00 ml internog standarda (tačka 3.27.3.) i zatim dopuni citratnim puferom (tačka 3.24.) do oznake, intenzivno se promiješa i nastavlja se sa hromatografijom (tačka 5.4.).

Ako se rastvor uzorka ne analizira isti dan, mora se čuvati na temperaturi nižoj od 5 °C.

5.4. Hromatografija

Prije hromatografije temperaturu ekstrakta (tačka 5.2.) ili hidrolizata (tačka 5.3.4.) treba izjednačiti sa sobnom temperaturom.

Smješa se promućka i odgovarajuća količina filtrira kroz membranski filter 0,22 µm (tačka 4.5.), a dobijeni bistri rastvor se podvrgne hromatografiji sa izmjenom jona upotrebom analizatora aminokisjelina (tačka 4.9.).

Ubrizgavanje se može izvesti ručno ili automatski, a na kolonu za analizu standarda i uzoraka dodaje se ista količina rastvora (±0,5%), osim kada se koristi interni standard, a odnos natrijuma i aminokisjelina u rastvorima standarda i uzorka treba da budu po mogućnosti što sličniji.

Opšta učestalost kalibracije zavisi od stabilnosti reagensa ninhidrina i sistema za analizu.

Standard ili uzorak se razblaže citratnim puferom (tačka 3.24.) tako da površina pika standarda dostiže 30–200% površine pika aminokisjelina u uzorku.

Hromatografija aminokisjelina neznatno se razlikuje, obzirom na vrstu korišćenog analizatora i smole.

Odabrani sistem mora imati mogućnost razdvajanja aminokisjelina međusobno i od drugih materija koje reagiraju na ninhidrin, a u radnom području hromatografski sistem mora imati linearan odziv na promjene količina aminokisjelina dodanih na kolonu.

U fazi hromatografije primjenjuju se odnosi između najnižih i najviših vrijednosti kod analize ekvimolarnih rastvora (aminokisjelina koje se određuju), a ekvimolarni rastvor mora sadržati najmanje 30% maksimalnog udjela svake aminokisjelina koji se može tačno izmjeriti sistemom za analizu aminokisjelina (tačka 4.9.).

Kod postupka razdvajanja treonina od serina, odnos između najniže i najviše vrijednosti za aminokisjelinu sa nižom vrijednošću između dvije aminokisjeline koje se preklapaju na hromatogramu ne smije preći 2:10. (Ako se određuju samo cist(e)in, metionin, treonin i lizin, nedovoljno razdvajanje između susjednih pikova ometaće postupak određivanja). Za sve druge aminokisjeline razdvajanje mora biti veće od 1:10.

Sistem mora garantovati razdvajanje lizina od „lizijskih artefakata” i omitina.

6. Izračunavanje rezultata

Za svaku pojedinačnu aminokisjelinu izmjeri se površina pika uzorka i standarda, a količina (X), prikazana u g aminokisjelina na kg uzorka, izračunava se na sljedeći način:

$$X = \frac{A \cdot c \cdot M \cdot V}{B \cdot m \cdot 1000}$$

Ako se koristi interni standard pomnoži se sa:

$$\frac{D}{C}$$

gdje je:

A - površina pika hidrolizata ili ekstrakta

B - površina pika standardnog kalibracionog rastvora

C - površina pika hidrolizata ili ekstrakta

D - površina pikova standardnog kalibracionog rastvora, internog standard

M - molarna masa aminokisjelina koja se određuje

c - koncentracija standarda u µmol/ml

m – masa uzorka u gramima (korigovana na početnu masu ako je uzorak osušen ili odmašćen)

V - ml ukupnog hidrolizata (tačka 5.3.4.) ili izračunata ukupna zapremina ekstrakta (tačka 6.1.) u ml

Cistin i cistein se određuju kao cisteinska kisjelina u hidrolizatima oksidovnog uzorka, ali se izračunavaju kao cistin (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol)

upotrebom molarne mase 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

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

Dodati slobodni metionin određuje se nakon ekstrakcije kao metionin, a za obračun se koristi ista molekulska masa.

6.1. Ukupna zapremina rastvora ekstrakta (F) za određivanje slobodnih aminokisjelina (tačka 5.2.) izračunava se sljedećom formulom:

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

gdje je:

V – zapremina konačnog ekstrakta

7. Vrednovanje metode

Rezultati srednjih vrijednosti i standardnih devijacija, bez ekstremnih vrijednosti, prikazani su u sljedećoj tabeli:

Srednje vrijednosti u g/kg

Referentni materijal	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin

Miješana hrana za svinje	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Krmna sješa za piliće u tovu	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Proteinski koncentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16
n = Broj uključenih laboratorija.				

7.1. Ponovljivost.

Ponavljanje međulaboratorijskog poređenja iz prethodne tabele prikazana kao „unutarlaboratorijska standardna devijacija“, prikazana je u sljedećim tabelama:

Referentni materijal	Koeficijent varijacije (%) za ponovljivost (Cvr)			
	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Smjesa za brojere	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Proteinski koncentrat	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16
n = Broj uključenih laboratorija.				

7.2. Obnovljivost

Rezultati prethodno navedenog međulaboratorijskog poređenja prikazana kao „unutarlaboratorijska standardna devijacija“, prikazana je u sljedećoj tabeli:

Referentni materijal	Koeficijent varijacije (%) za ponovljivost (Cvr)			
	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Smjesa za brojere	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Proteinski koncentrat	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16
n = Broj uključenih laboratorija.				

8. Upotreba referentnih materijala

Pravilna primjena metode provjerava se ponovljenim mjerenjima na sertifikovanim referentnim materijalima, kada su dostupni, pri čemu je potrebno izvršiti kalibraciju upotrebom sertifikovanog rastvora za kalibraciju aminokisjelina.

9. Napomene

9.1. Zbog razlika između analizatora aminokisjelina, kao smjernice se uzimaju konačne koncentracije rastvora standardnih aminokisjelina za kalibraciju iz tač. 3.27.4. i 3.27.5. ovog dijela i hidrolizata tačke 5.3.4. ovog dijela.

Za sve aminokisjeline treba provjeriti područje linearnog odziva uređaja.

Standardni rastvor se razblaži citratnim puferom tako da se površine pikova nalaze u sredini područja.

9.2. Kada se za analizu hidrolizata koristi oprema za tečnu hromatografiju visoke efikasnosti, uslovi oglada se moraju optimizirati u skladu sa preporukama proizvođača.

9.3. Kod primjene metode krmne smješe ili premikse koji sadrže više od 1% hlorida (koncentrat, mineralna hrana za životinje, dodaci hrani za životinje) može doći do preniske procjene sadržaja metionina, što zahtijeva posebnu obradu.

10. Kriterijum djelotvornosti

Prikupljanjem rezultata (osim za tirozin) iz dvije međulaboratorijske studije dobijeni su sljedeći kriteriji za ponovljivost i obnovljivost. Moguće je da se vrijednosti dobijene u ta dva međulaboratorijska ispitivanja neće moći primijeniti na raspon koncentracija i matrice drukčije od navedenih.

10.1. Ponovljivost

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

- 6 % veće vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju glicina, alanina, lizina, prolina, glutaminske kiseline, izoleucina i histidina,
- 8 % veće vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju treonina, fenilalanina, metionina, aspartatne kiseline i leucina,
- 10 % veće vrijednosti za ukupne aminokiseline u slučaju arginina i valina,
- 12 % veće vrijednosti za ukupnu aminokiselinu serin,
- 15 % veće vrijednosti za ukupnu aminokiselinu cist(e)in

10.2. Obnovljivost

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

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

Dio VII ODREĐIVANJE TRIPTOFANA

Analičke metode koje se koriste za određivanje triptofana su sledeće:

- EN ISO 13904 Hrana za životinje-Određivanje količine triptofana
- Analitička metoda kako je opisana u tačkama od 1. do 9. u nastavku

1. Predmet i područje primjene

Određivanje ukupnog i slobodnog triptofana u hrani za životinje vrši se primjenom sljedeće metode, kojom se ne omogućava razlikovanje između oblika D i L.

2. Princip

Za određivanje ukupnog triptofana uzorak se hidrolizuje u baznim uslovima zasićenim rastvorom barijum hidroksida i 20 sati zagrijava na 110° C, a nakon hidrolize dodaje se interni standard.

Za određivanje slobodnog triptofana uzorak se ekstrahuje u slabo kiselim uslovima u prisustvu internog standarda.

Triptofan i interni standard u hidrolizatu ili ekstraktu određuju se postupkom HPLC sa fluorescentnom detekcijom.

3. Reagensi

3.1. Obavezno se koristi redestilovana voda ili voda sličnog kvaliteta (provodljivost < 10 µS/cm).

3.2. Interni standard: triptofan (čistoća/sadržaj ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosfor pentoksida.

3.3. Interna standardna materija: α-metil-triptofan (čistoća/sadržaj ≥ 99 %), osušen pod vakuumom iznad fosfor pentoksida.

3.4. Barijum hidroksid oktahidrat (treba paziti da se Ba(OH)₂ · xH₂O pretjerano ne izlaže vazduhu kako bi se izbjeglo nastajanje BaCO₃ koji može poremetiti postupak određivanja).

3.5. Natrijum hidroksid.

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

3.7. Hlorovodonična kiselina, p₂₀ 1,19 g/ml.

3.8. Metanol, za HPLC.

3.9. Petrol etar, raspon tačke ključanja 40–60° C.

3.10. Rastvor natrijum hidroksida, c = 1 mol/l:

U vodi se rastvori 40,0 g NaOH (tačka 3.5.) i dopuni vodom do 1 litra (tačka 3.1.).

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

Uzme se 492 ml HCl (tačka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litra.

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

Uzme se 82 ml HCl (tačka 3.7.) i dopuni vodom do 1 litra.

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

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

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

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

3.15. Koncentrovani rastvor triptofana (tačka 3.2.), c = 2,50 µmol/ml:

U odgovarajućem sudu zapremine 500 ml rastvori se 0,2553 g triptofana (tačka 3.2.) u hlorovodoničnoj kiselini (tačka 3.13.) i dopuni hlorovodoničnom kiselinom (tačka 3.13.) do oznake i čuva se najduže 4 nedelje na –18° C.

3.16. Koncentrovani rastvor internog standarda, c = 2,50 µmol/ml:

U odgovarajućem sudu zapremine 500 ml rastvori se 0,2728 g α-metil-triptofana (tačka 3.3.) u hlorovodoničnoj kiselini (tačka 3.13.) i dopuni hlorovodoničnom kiselinom (tačka 3.13.) do oznake i čuva se najduže 4 nedelje na –18° C.

3.17. Standardni rastvor triptofana i internog standarda za kalibraciju:

Pripremi se 2,00 ml koncentrovanog rastvora triptofana (tačka 3.15.) i 2,00 ml koncentrovanog rastvora internog standarda (α-metil-triptofan) (tačka 3.16.).

Razblaži se vodom (tačka 3.1.) i metanolom (tačka 3.8.) na približno jednaku zapreminu i približno jednaku koncentraciju metanola (10–30%) kao kod konačnog hidrolizata, a rastvor se mora pripremiti sveže prije upotrebe i treba da bude zaštićen od direktnog sunčevog svjetla.

3.18. Sirćetna kiselina.

3.19. 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanol.

3.20. Etanolamin, m (m/m) >98%.

3.21. Rastvor 1 g 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (tačka 3.19.) u 100 ml metanola (tačka 3.8.).

3.22. Mobilna faza za HPLC: 3,00 g sirćetne kiseline (tačka 3.18.) + 900 ml vode (tačka 3.1.) + 50,0 ml rastvora (tačka 3.21.) 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (tačka 3.19.) u metanolu (tačka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanolaminom (tačka 3.20.) se vrijednost pH podesi na 5,00. Dopuni se vodom (tačka 3.1.) do 1000 ml.

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa spektrofotometrijskim detektorom.

4.2. Kolona za tečnu hromatografiju, 125 mm×4 mm C₁₈, veličina čestica punjenja 3 µm ili ekvivalentna.

4.3. pH metar.

4.4. Polipropilenska tikvica, zapremine 125 ml, sa širokim vratom i navojnim čepom.

4.5. Membranski filter, 0,45 µm.

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

4.7. Mehanička mućkalica ili magnetna mješalica.

4.8. Vrtložna mješalica.

5. Postupak

5.1. Priprema uzoraka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine 0,5 mm.

Uzorci sa visokim sadržajem vlage moraju se prije usitnjavanja osušiti na temperaturi koja ne prelazi 50° C ili liofilizacijom.

Uzorci sa visokim sadržajem masti ekstrahuju se petro, etrom (tačka 3.9.) prije usitnjavanja.

5.2. Određivanje slobodnog triptofana (ekstrakt)

Izmjeri se pogodna količina (1–5 g) pripremljenog uzorka (tačka 5.1.) sa preciznošću od 1 mg i prenese u erlenmajer i doda se 100,0 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.13.) i 5,00 ml koncentrovanog rastvora internog standarda (tačka 3.16.), a zatim mućka se ili miješa 60 minuta mehaničkom mućkalicom ili magnetnom mješalicom (tačka 4.7.) i pričekava se da talog padne na dno i pipetom prenese 10,0 ml supernatanta u čašu. Doda se 5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.14.).

Natrijum hidroksidom (tačka 3.10.) se pH vrijednost rastvora podesi na 3 i doda se dovoljno metanola (tačka 3.8.) kako bi u konačnoj zaremni koncentracija metanola iznosila 10–30%.

Prenese se u sud pogodne zapremine i razblaži vodom na zapreminu potrebnu za hromatografiju (približno jednaka zapremina volumen kao kod standardnog kalibracionog rastvora (tačka 3.17.)).

Prije ubrizgavanja na kolonu za HPLC filtrira se nekoliko ml rastvora kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.5.) i nastavlja se sa hromatografijom u skladu sa tačkom 5.4. ovog dijela.

Standardni rastvor i ekstrakti treba da budu zaštićeni od direktne sunčeve svjetlosti, a ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se čuvati na temperaturi od 5 °C u najduže tri dana.

5.3. Određivanje ukupnog triptofana (hidrolizat)

Izmjeri se 0,1–1 g pripremljenog uzorka (tačka 5.1.) s apreciznošću od 0,2 mg i prenese u polipropilensku tikvicu (tačka 4.4.).

Sadržaj azota u izmjerenom dijelu uzorka mora iznositi približno 10 mg.

Doda se 8,4 mg barijum hidroksid oktahidrata (tačka 3.4.) i 10 ml vode i miješa se vrtložnom mješalicom (tačka 4.8.) ili magnetnom mješalicom (tačka 4.7.), a usmješi se ostavi magnet obložen teflonom.

Zidovi posude se isperu sa 4 ml vode, a tikvica se poklopi navojnim čepom i lagano zatvori, prenese se u autoklav (tačka 4.6.) sa vrelom vodom i ostavi u pari 30–60 minuta i autoklav se zatvori i 20 sati autoklavira na 110 (±2) °C.

Prije otvaranja autoklava, temperatura se snizi na malo ispod 100° C. kako bi se spriječila kristalizacija Ba(OH)₂·xH₂O, u toplu smjesu se doda 30 ml vode sobne temperature, lagano se promućka ili promiješa i doda se 2,00 ml koncentrovanog rastvora internog standarda (α-metil-triptofana) (tačka 3.16.), a posude se 15 minuta hlade u vodenom/ledenom kupatilu.

Zatim se doda 5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.14.).

Posuda se drži u kupki za hlađenje i uz miješanje neutrališe sa HCl (tačka 3.11.), a pH vrijednost se podesi na 3,0 sa HCl (tačka 3.12.) i doda se dovoljno metanola kako bi u konačnoj zapremini koncentracija metanola iznosila 10–30 %.

Prenese se u sud odgovarajuće zapremine i razblaži vodom do zapremine potrebne za hromatografiju (na primjer, 100 ml), a dodavanje metanola ne smije izazvati taloženje.

Prije ubrizgavanja na HPLC kolonu nekoliko ml rastvora se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.5.) i nastavlja se sa hromatografijom u skladu s tačkom 5.4.

Standardni rastvor i hidrolizati se zaštitite od direktne sunčeve svjetlosti, ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se čuvati na temperaturi od 5 °C u vremenu od najduže 3 dana.

5.4. Određivanje HPLC-om

Za izokratsko eluiranje se kao smjernice predlažu sljedeći uslovi; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati (vidjeti napomene pod tačkama 9.1. i 9.2.)

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.2):	125 mm×4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 3 µm ili ekvivalentna
Temperatura kolone:	sobna temperatura
Mobilna faza (tačka 3.22.):	3,00 g sirćetne kiseline (tačka 3.18.) + 900 ml vode (tačka 3.1.) + 50,0 ml rastvora (tačka 3.21.) 1,1,1-trihlor-2-metil-2-propanola (tačka 3.19.) u metanolu (tačka 3.8.) (1 g/100 ml). Etanolaminom (tačka 3.20.) se pH vrijednost rastvora podesi na 5,00. Dopuni se vodom (tačka 3.1.) do 1000 ml.
Brzina protoka:	1 ml/min
Ukupno trajanje eluiranja:	oko 34 min
Talasna dužina detekcije:	ekscitacija: 280 nm, emisija: 356 nm.
Zapremina injektiranja	20 µl

6. Izračunavanje rezultata

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

$$X = \frac{A \cdot B \cdot V_1 \cdot c \cdot V_2 \cdot M}{C \cdot D \cdot V_3 \cdot 10000 \cdot m}$$

gdje je:

A - površina pika internog standarda, standardni kalibracioni rastvor

B - površina pika triptofana, ekstrakt (tačka 5.2.) ili hidrolizat (tačka 5.3)

V₁ - zapremina, u ml (2 ml), koncentrovani rastvor triptofana (tačka 3.15.) dodat u kalibracioni rastvor (tačka 3.17.)

c - koncentracija, u µmol/ml (= 2,50) koncentrovanog rastvora triptofana (tačka 3.15) dodatog u kalibracioni rastvor (tačka 3.17.)

V₂ - zpremina, u ml, koncentrovanog rastvora internog standarda (tačka 3.16.) dodatog pri ekstrakciji (tačka 5.2.) (= 5,00 ml) ili u hidrolizat (tačka 5.3.) (= 2,00 ml)

C - površina pika internog standarda, ekstrakt (tačka 5.2.) ili hidrolizat (tačka 5.3)

D - površina pika triptofana, standardni kalibracioni rastvor (tačka 3.17)

V₃ - zapremina, u ml (= 2,00 ml), koncentrovanog rastvora internog standarda (tačka 3.16.), dodatog standardni kalibraconi rastvor (tačka 3.17.)

m - masa uzorka u g (korigovna na polaznu masu ako je uzorak osušen i/ili obezmašćen)

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

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja, izvedenija na istom uzorku, ne smije preći 10% u odnosu na najviši rezultat.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Analizirano je tri uzorka u 12 laboratorija, a svaki uzorak je analiziran pet puta rezultati su prikazani u sljedećoj tabeli:

	Uzorak 1 Hrana za svinje	Uzorak 2 Hrana za svinje sa dodatim L- triptofanom	Uzorak 3 Koncentrat hrane za svinje
L	12	12	12
n	50	55	50
Srednja vrijednost [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

n - broj korišćenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identifikovanih Cochran-Dixon-ovim testom za ekstremne vrijednosti)

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Analizirano je dva uzorka u trinaest laboratorija za potvrđivanje metode za ekstrakciju slobodnog triptofana, svaki uzorak se analizirao pet puta, a rezultati su prikazani u sljedećoj tabeli:

	Uzorak 4 Smjesa pšenice i soje	Uzorak 5 Smjesa pšenice i soje (=uzorak 4) sa dodatim triptofanom (0,457 g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Srednja vrijednost [g/kg]	0,391	0,931

s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

n - broj korištenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identifikovanih Cochran-Dixon-ovim testom za ekstremne vrijednosti)

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti u %

Analizirano je četiri uzorka u sedam laboratorija za potvrđivanje triptofana za hidrolizu, a svaki uzorak je analiziran pet puta, rezultati su prikazani u sljedećoj tabeli:

	Uzorak 1 Miješana hrana za svinje (CRM 117)	Uzorak 2 Riblje brašno s niskim učestvom masti (CRM 118)	Uzorak 3 Sojino brašno (CRM 119)	Uzorak 4 Obrano mlijeko u prahu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Srednja vrijednost [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

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

n - broj korištenih pojedinačnih rezultata bez ekstremnih vrijednosti (identifikovanih Cochran-Dixon-ovim testom za ekstremne vrijednosti)

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti u %

9. Napomene

9.1. Bolje razdvajanje triptofana i α -metil-triptofana može se postići sljedećim hromatografskim uslovima. Izokratsko eluiranje, nakon kojeg slijedi gradijentno čišćenje kolone:

Kolona za tečnu hromatografiju:	125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , veličinačestica punjenja 5 μ m ili ekvivalentna		
Temperatura kolone:	32 °C		
Mobilna faza:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metanol, 95 + 5 (V + V). B: Metanol		
Gradijentni program:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B
Brzina protoka:	1,2 ml/min		
Ukupno trajanje eluiranja:	oko 33 min		

9.2. Postupak hromatografije se razlikuje s obzirom na vrstu HPLC-a i korišćeni materijal za punjenje kolone, a odabrani sistem mora obezbjediti razdvajanje bazne linije triptofana i internog standarda i sprovi se postupak sa hidrolizatima bez internog standarda za provjeru bazne linije internog standarda na nečistoće, a vrijeme eluiranja bude dovoljno za eluiranje svih produkata razgradnje, a kašnjenje pikova eluiranja bi moglo poremetiti kasnije postupke hromatografiranja.

U radnom području hromatografski sistem mora imati linearni odziv, a linearni odziv se mjeri sa konstantnom (uobičajenom) koncentracijom internog standarda i različitim koncentracijama triptofana, a veličine pikova triptofana i internog standarda treba da budu u linearnom području sistema za HPLC/fluorescenciju.

Ako su pikovi triptofana i/ili internog standarda prenisiki ili previsoki, analizu treba ponoviti sa drugom količinom uzorka i/ili drugom krajnjom zapreminom.

9.3. Barijum hidroksid

Posljedica toga je mutni rastvor za HPLC smanjuje se vremenom što može dovesti do niskih rezultata za triptofan.

Dio VIII

ODREĐIVANJE SIROVIH ULJA I MASTI

1. Predmet i primjena metode

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

Primjena dolje navedenih postupaka zavisi od vrste i sastava hrane za životinje i razlogu za sprovednje analize.

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

1.1. Postupak A – Sirova ulja i masti koja se ekstrahuju direktno Postupak A koristi se za hranu za životinje biljnog porijekla, osim sirovih ulja i masti.

1.2. Postupak B – Ukupna sirova ulja i masti

Koristi se za hranu za životinje životinjskog porijekla i za sve krmne smješe, sve sirovine za dobijanje životinjske hrane iz kojih se bez prethodne hidrolize ne mogu potpuno ekstrahovati ulja i masti (npr. gluteni, kvasac, krompirovi proteini i proizvodi koji se podvrgavaju postupcima poput istiskivanja, pahuljičanja i zagrijavanja).

1.3. Tumačenje rezultata

Kada je rezultat dobijen postupkom B viši od rezultata dobijenog postupkom A uvijek se kao tačna vrijednost uzima rezultat dobijen postupkom B.

2. Princip

2.1. Postupak A

Uzorak se ekstrahuje petroletrom, a rastvarač se ukloni destilacijom, a ostatak osuši i izmjeri.

2.2. Postupak B

Uzorak se uz zagrijavanje obradi hlorovodoničnom kiselinom, a smješa se ohladi i filtrira, ostatak se ispere i osuši, a zatim se izvrši određivanje u skladu sa postupkom A.

3. Reagensi

3.1. Petroletar, raspon ključanja 40–60° C. Bromni broj mora biti niži od 1, a ostatak nakon isparenja manji od 2 mg/100 ml.

3.2. Natrijum sulfat, bezvodni.

3.3. Hlorovodonična kiselina, c = 3 mol/l.

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

4. Oprema

4.1. Uređaj za ekstrakciju, a ako je uređaj opremljen sifonom (Soxhlet aparat), brzina refluksa mora biti takva da proizvodi približno 10 ciklusa na sat; ako nije opremljen sifonom, brzina povratnog toka mora iznositi približno 10 ml u minuti.

4.2. Hilzne za ekstrakciju, bez materija rastvorljivih u petrol etru i poroznosti u skladu sa zahtjevima iz tačke 4.1 ovog dijela.

4.3. Vakuum sušnica podešena na (75±3)° C, ili vazдушna podešena na (100±3)° C.

5. Postupak

5.1. Postupak A

Izmjeri se 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg, prenese u hilznu za ekstrakciju (tačka 4.2.) i pokrije čepom od vate koji ne sadrži masti.

Hilzna se postavi u ekstraktor (tačka 4.1.) i šest sati ekstrahuje petrol etrom (tačka 3.1.). Ekstrakt petrol etra se sakupi u suvu, izmjerenu posudu koja sadrži komadiće plovuča.²

Rastvor se ukloni destilacijom, a ostatak se osuši tako da se posuda sat i po drži u sušnici (tačka 4.3.) i ostavi se da se ohladi u eksikatoru pa se izmjeri i ponovo se suši 30 minuta kako bi se obezbjedila konstantna masa ulja i masti (gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne smije preći 1 mg).

5.2. Postupak B

Izmjeri se 2,5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg, prenese u čašu zapremine 400 ml ili erlenmajer zapremine 300 ml i doda 100 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.3.) i komadićai plovuča i čaša se pokrije satnim staklom ili se erlenmajer spoji s akondenzatorom sa povratnim protokom, smješa se polagano dovede do ključanja iznad niskog plamena ili na električnoj grejnoj ploči i tamo ostavi jedan sat s tim da se uzorak ne smije zalijepiti za zidove posude.

Ohladi se i doda onoliko sredstva za filtriranje (tačka 3.4.) koliko je potrebno da tokom filtriranja ne dođe do gubitka ulja i masti, a filtrira se kroz navlažen dvostruki filter papir koji ne sadrži masti, ostatak se ispere hladnom vodom sve dok filtrat ne postane neutralan i treba provjeriti da filtrat ne sadrži nikakva ulja ili masti, jer njihovo prisustvo znači da se uzorak prije hidrolize mora ekstrahovati petrol etrom primjenom postupka A.

Dvostruki filter papir na kojem je ostatak prenese se na sahatno staklo i sat i po suši u sušnici (tačka 4.3.) na (100±3)° C.

Dvostruki filter papir sa suvim ostatkom se prenese u hilznu za ekstrahovanje (tačka 4.2.) i pokrije čepom od vate koji ne sadrži masti, hilzna se postavi u ekstraktor (tačka 4.1.) i postupak nastavi kako je u skladu sa st. 2 i 3 tačke 5.1. ovog dijela.

5.3. Postupak A i ponovna ekstrakcija postupkom B

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

To znači da se nakon ekstrakcije petroleterom (postupak A) ostatak ili dio ostatka ponovo ekstrahuje hlorovodičnom kiselinom (postupak B). Učešće sirovih ulja i masti je zbir rezultata postupka A i B.

6. Prikaz rezultata

Masa ostatka iskazuje se kao procentni sadržaj uzorka.

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja koje na istom uzorku izvodi isti analitičar ne smije prijeći:

- 0,2% apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih ulja i masti manje od 5%,
- 4,0% višeg rezultata za sadržaj od 5–10%,
- 0,4% apsolutne vrijednosti za sadržaj iznad 10%.

8. Napomene

8.1. Kod proizvoda sa visokim sadržajem ulja i masti koji se teško usitnjavaju ili nijesu pogodni za pripremanje homogenog smanjenog uzorka za ispitivanje primjenjuje se sljedeći postupak.

Izmjeri se 20 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i pomiješa sa 10 g ili više bezvodnog natrijum sulfata (tačka 3.2.), ekstrahuje se petrol etrom (tačka 3.1.) u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela i ekstrakt se dopuni petrol etrom (tačka 3.1.) do 500 ml i promiješa, zatim se uzme se 50 ml rastvora i prenese u suvu, izmjerenu posudu sa komadićima plovuča, destilacijom se ukloni rastvor, osuši se i nastavi postupak u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela.

Iz ostatka ekstrakcije koji se nalazi u erlenmajeru ukloni se rastvor, ostatak se usitni do veličine čestica 1 mm i vrati u erlenmajer za ekstrakciju (ne dodaje se natrijum sulfat), zatim se nastavi u skladu sa tačkom 5.1. st. 2 i 3 ovog priloga.

Udio ulja i masti kao procentni sadržaj uzorka izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m₁ - masa ostatka nakon prve ekstrakcije (aliquotni dio ekstrakta) u gramima,

m₂ - masa ostatka nakon druge ekstrakcije u gramima.

8.2. Kod proizvoda sa niskim sadržajem ulja i masti uzorak za ispitivanje se može povećati na 5 g.

8.3. Hranu za kućne ljubimce sa visokim sadržajem vlage ponekad prije hidrolize i ekstrakcije treba pomiješati sa bezvodnim natrijum sulfatom, u skladu sa postupkom B.

8.4. U tački 5.2, za ispiranje ostatka nakon filtracije efikasnije bi bilo koristiti vruću vodu umjesto hladne vode.

8.5. Za određenu hranu za životinje može se produžiti vrijeme sušenja na više od 1,5 h, s tim da treba izbjegavati prekomjerno sušenje zato što može dovesti do niskih rezultata, a može se koristiti i mikrotalasna peč.

Dio IX ODREĐIVANJE SIROVIH VLAKNA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje bezmasnih organskih materija u hrani za životinje koje se ne rastvaraju u kiselim i baznim sredinama (sirova vlakna) vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

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

2. Princip

Uzorak se prema potrebi odmast i uzastopno obradi vrelim rastvorima sumporne kiseline i kalijum hidroksida u navedenim koncentracijama, a ostatak se odvaja filtracijom kroz filter od sinterovanog stakla, ispere, osuši, izmjeri i žari na 475 – 500° C, gubitak mase žarenja treba da odgovara sadržaju sirovih vlakana u uzorku za ispitivanje.

3. Reagensi

3.1. Sumporna kiselina, c = 0,13 mol/l.

3.2. Sredstvo protiv stvaranja pjene (npr. n-oktanol).

3.3. Sredstvo za filtriranje (Celite 545 ili ekvivalent), koje se četiri sata žari na 500 °C (tačka 8.6.).

3.4. Aceton.

3.5. Petroletar sa rasponom tačke topljenja od 40–60° C.

² - Kada se ulje ili mast podvrgavaju dodatnom ispitivanju kvaliteta, djelovi plovuča zamjenjuju se staklenim kuglicama..

- 3.6. Hlorovodonična kiselina, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.
3.7. Rastvor kalijum hidroksida, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Oprema

- 4.1. Grejna jedinica za mineralizaciju rastvora sumporne kiseline i kalijum hidroksida, opremljena dodatkom za filterski lončić (tačka 4.2.) i ispusnom cijevi koja je preko slavine priključena na tečnost i vakuum, po mogućnosti sa sabijenim vazduhom, s tim što prije početka upotrebe se pet minuta zagrijava vrelom vodom.
4.2. Stakleni filterski lončić sa filterskom pločom od sinterovanog stakla, veličine pora $40\text{--}90 \text{ }\mu\text{m}$ koji prije upotrebe treba nekoliko minuta zagrijati na 500°C i ohladiti (tačka 8.6.).
4.3. Valjak zapremine najmanje 270 ml sa kondenzatorom sa povratnim protokom, pogodan za ključanje.
4.4. Sušnica s termostatom
4.5. Mufolna peć s termostatom
4.6. Jedinica za ekstrakciju sastavljena od nosive ploče za filterski lončić (tačka 4.2.) i ispusne cijevi koja je preko slavine priključena na tačnost i vakuum.
4.7. Spojni prstenovi za sklapanje grejne jedinice (tačka 4.1.), lončića (tačka 4.2.) i valjka (tačka 4.3.) i za priključivanje jedinice za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.) i lončića.

5. Postupak

Izmjeri se 1 g pripremljenog uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u lončić (tačka 4.2.) (vidjeti napomene pod tačkama 9.1., 9.2. i 9.3.) pa se doda 1 g sredstva za filtriranje (tačka 3.3.).

Sklopi se grejna jedinica (tačka 4.1.) i filterski lončić (tačka 4.2.), a zatim se valjak (tačka 4.3.) priključi na lončić, a usklobljeni valjak i lončić nališe se 150 ml vrele sumporne kiseline (tačka 3.1.) i prema potrebi nekoliko kapi sredstva protiv stvaranja pjene (tačka 3.2.).

Tečnost se zagrijava do ključanja u vremenu od 5 ± 2 minuta i ostavi da snažno ključa tačno 30 minuta.

Otvori se slavina na ispusnoj cijevi (tačka 4.1.), sumporna kiselina se pod vakuumom filtrira kroz filterski lončić i ostatak se tri puta uzastopno ispere sa po 30 ml vrele vode, pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suva.

Ispusna slavinu se zatvori, u sklop cilindar-lončić nališe se 150 ml vrelom rastvoru kalijum hidroksida (tačka 3.7.) i doda se nekoliko kapi sredstva protiv stvaranja pjene (tačka 3.2.), a tečnost se zagrijava do tačke ključanja u vremenu od 5 ± 2 minuta i ostavi snažno da ključa tačno 30 minuta, filtrira se i ponovi postupak ispiranja kao kod sumporne kiseline.

Nakon konačnog ispiranja i sušenja, lončić sa sadržajem se odvoji i priključi na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.) i ostatak u lončiću se pod vakuumom tri puta uzastopno ispere sa po 25 ml acetona (tačka 3.4.), pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suva.

Lončić se osuši u sušnici na 130°C do konstantne mase, nakon svakog sušenja ohladi se u eksikatoru i brzo izmjeri i stavi u mufolnu peć i zagrijava najmanje 30 minuta na $475\text{--}500^\circ \text{C}$ do konstantne mase (gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne smije preći 2mg).

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

Izvodi se sljedeća proba bez uzorka, a gubitak mase pri žarenju ne smije prijeći 4 mg.

6. Izračunavanje rezultata

Sadržaj sirovih vlakana, iskazan kao procentni sadržaj uzorka, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

m - masa uzorka u gramima,

m_0 - gubitak mase nakon kaljenja tokom postupka određivanja, u gramima,

m_1 - gubitak mase nakon kaljenja tokom sljepe probe, u gramima.

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći:

- 0,6% apsolutne vrijednosti za sadržaj sirovih vlakana manji od 10%,
- 6% veće vrijednosti za sadržaj sirovih vlakana jednak ili veći od 10%.

8. Obnovljivost

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

- 1,0 % apsolutne vrijednosti za učešće sirovih vlakana manji od 10 %,
- 10 % višeg rezultata za učešće sirovih vlakana jednak ili veći od 10 %.

9. Napomene

9.1. Hranu za životinje koja sadrži više od 10% sirovih masti prije analize treba odmastiti petrol etrom (tačka 3.5.).

Lončić za filtriranje (tačka 4.2.) sa sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.), a ostatak se pod vakuumom tri puta ispere sa po 30 ml petrol etra, pri čemu treba provjeriti da je ostatak suv, a nakon što se lončić sa sadržajem priključi na grejnu jedinicu (tačka 4.1.), nastavlja se postupak iz tačke 5 ovog dijela.

9.2. Hranu za životinje koja sadrži masti koje se ne mogu direktno ekstrahovati petrol etrom (tačka 3.5.), treba odmastiti u skladu sa tačkom 8.1. i ponovo odmastiti nakon ključanja sa kiselinom, a nakon ključanja sa kiselinom i naknadnog ispiranja, lončić sa sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.) i tri puta ispere sa po 30 ml acetona i tri puta sa po 30 ml petrol etra, filtrira se pod vakuumom i sprovodi postupak u skladu sa tačkom 5 ovog dijela, s tim da postupak započne dodavanjem kalijum hidroksida.

9.3. Ako hrana za životinje sadrži više od 5% karbonata, izraženih kao kalcijum karbonat, lončić (tačka 4.2.) sa izmjerenim uzorkom se priključi na grejnu jedinicu (tačka 4.1.). Uzorak se tri puta ispere sa po 30 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.6.), a nakon svakog dodavanja, uzorak se ostavi približno jedan minut prije filtriranja i ispere se sa 30 ml vode i postupak nastavi u skladu sa tačkom 5 ovog dijela.

9.4. Ako se koristi uređaj u obliku stalka (nekoliko lončića priključenih na istu grejnu jedinicu), u istoj se seriji ne smiju izvesti dva postupka određivanja na istom uzorku za analizu.

9.5. Ako se kiseli i bazni rastvori nakon ključanja teško filtriraju, propusti se zbijeni vazduh kroz ispusnu cijev grejne jedinice i nastavi s filtriranjem.

9.6. Temperatura žarenja ne smije preći 500°C kako bi se produžio vijek trajanja staklenih filterskih lončića, zbog čega se mora voditi računa da ne dodade do pretjeranog toplotnog šoka između ciklusa grijanja i hlađenja.

Predmet i područje primjene

Određivanje količine redukujućih šećera i ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza ili kao saharoza, prema potrebi sa faktorom konverzije 0,95 u krminim smjesama vrši se prema sljedećoj metodi. Koristi se za krmne smjese. Za drugu hranu za životinje upotrebljavaju se posebne metode. Laktoza se određuje odvojeno i uzima u obzir pri izračunavanju rezultata.

Ovu metodu treba primjenjivati za određivanje učešća šećera pri izračunavanju energetske vrijednosti hrane za životinje.

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

1. Princip

Šećeri se ekstrahiraju razblaženim etanolom, rastvor se izbistri rastvorima Carrez I i Carrez II, a nakon uklanjanja etanola određuju se količine prije i nakon inverzije Luff-Schoorl-ovom metodom.

2. Reagensi

2.1. Rastvor etanola 40% (v/v) gustine: 0,948 g/ml na 20° C, neutralisan prema fenoltaleinu.

2.2. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g glacijalne sirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

2.3. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $K_4Fe(CN)_6 \cdot xH_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

2.4. Metiloranž, rastvor 0,1% (m/v).

2.5. Hlorovodonična kiselina, 4 mol/l.

2.6. Hlorovodonična kiselina, 0,1 mol/l.

2.7. Rastvor natrijum hidroksida, 0,1 mol/l.

2.8. Luff-Schoorl-ov reagens:

Uz oprezno miješanje, u rastvor natrijum karbonata (tačka 3.8.3.) ulije se rastvor limunske kiseline (tačka 3.8.2.), doda se rastvor bakar sulfata (tačka 3.8.1.), dopuni vodom do 1 litra i ostavi se preko noći i filtrira.

Provjeri se koncentracija dobijenog reagensa (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), vidjeti zadnji odlomak tačke 5.4. pH vrijednost rastvora mora iznositi približno 9,4.

2.8.1. Rastvor bakar sulfata: u 100 ml vode rastvori se 25 g bakar sulfata ($CuSO_4 \cdot xH_2O$) koji ne sadrži gvožđe.

2.8.2. Rastvor limunske kiseline: u 50 ml vode rastvori se 50 g limunske kiseline ($C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$).

2.8.3. Rastvor natrijum karbonata: u približno 300 ml tople vode rastvori se 143,8 g bezvodnog natrijum karbonata. Ostavi se da se ohladi.

2.9. Rastvor natrijum tiosulfata, 0,1 mol/l.

3.10. Rastvor skroba: u litar ključale vode doda se suspenzija 5 g rastvorljivog skroba u 30 ml vode. Ostavi se 3 minuta da vri, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

2.10. Sumporna kiselina, 3 mol/l.

2.11. Kalijum jodid, rastvor 30% (m/v).

2.12. Plovućac u zrn prokuvan u hlorovodičnoj kiselini, ispran vodom i osušen.

2.13. 3-metilbutan-1-ol.

3. Oprema

Mješalica (rotaciona): približno 35 do 40 obr/min.

4. Postupak

4.1. Ekstrakcija uzorka

Izmjeri se 2,5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u odgovarajući sud zapremine 250 ml i doda se 200 ml etanola (tačka 3.1.) i 1 sat miješa na mješalici, zatim se doda 5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.2.) i miješa približno 30 sekundi i 5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.3.) i ponovo miješa 1 minut, zatim se do oznake dopuni etanolom (tačka 3.1.), homogenizuje i filtrira.

Uzme se 200 ml filtrata i upari približno polovina kako bi se uklonila većina etanola, a toplom vodom ostatak nakon uparavanja se kvantitativno prenese u odgovarajući sud zapremine 200 ml, ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizuje i prema potrebi filtrira i rastvor se koristi za određivanje količine redukujućih šećera, a nakon inverzije, ukupnih šećera.

4.2. Određivanje redukujućih šećera

Pipetom se prenese najviše 25 ml rastvora koja sadrži manje od 60 mg redukovanih šećera, iskazanih kao glukoza, a prema potrebi se dopuni destilovanom vodom do 25 ml i Luff-Schoorl-ovom metodom odredi sadržaj redukujućih šećera, rezultat se izražava kao procenat glukoze sadržan u uzorku za analizu.

4.3. Određivanje ukupnih šećera nakon inverzije

Pipetom se prenese 50 ml rastvora u sud zapremine 100 ml i doda se nekoliko kapi rastvora metiloranža (tačka 3.4.), zatim se oprezno, uz stalno miješanje, dodaje hlorovodonična kiselina (tačka 3.5.) sve dok tečnost na postane potpuno crvena.

Doda se 15 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.6.), sud se uroni u vodu kupatilo koje snažno ključa i u njemu ostavi 30 minuta.

Brzo se ohladi na približno 20° C i doda 15 ml rastvora natrijum hidroksida (tačka 3.7.) i dopuni se vodom do 100 ml i homogenizuje.

Pipetom se prenese najviše 25 ml rastvora koja sadrži manje od 60 mg redukujućih šećera, iskazanih kao glukoza, a prema potrebi se dopuni destilovanom vodom do 25 ml i Luff-Schoorl-ovom metodom odredi sadržaj redukujućih šećera, a rezultat se iskazuje kao procentni udio glukoze ili, prema potrebi, saharoze što se dobije množenjem sa faktorom 0,95.

4.4. Titracija prema Luff-Schoorl-ovoj metodi

Pipetom se prenese 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa (tačka 3.8.) u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 300 ml; doda se tačno 25 ml izbistrenog rastvora šećera.

Dodaju se dva zrna plovućca (tačka 3.13.), zagrijava nad otvorenim plamenom srednje jačine, uz ručno miješanje, tako da tečnost proključa za približno dva minuta. Erlenmeyerova tikvica se odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom sa otvorom prečnika 6 cm, ispod kojeg se upali plamen, a plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice.

Na Erlenmeyerova tikvica se priključi na kondenzator sa povratnim protokom i ostavi se da ključa tačno 10 minuta, odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titruje na sljedeći način:

Doda se 10 ml rastvora kalijum jodida (tačka 3.12.) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenušanja) 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.11.).

Titruje se rastvorom natrijum tiosulfata (tačka 3.9.) do pojave mutno žute boje, doda se indikator skrob (tačka 3.10.) i dovrši titracija.

Ista titracija se izvede bez ključanja na tačno izmjerenoj smješi 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa (tačka 3.8.) i 25 ml vode, nakon dodavanja 10 ml rastvora kalijum jodida (tačka 3.12.) i 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.11.).

5. Izračunavanje rezultata

Količina glukoze određuje se u mg koja odgovara razlici između vrijednosti obje titracije, iskazanih u mg natrijum tiosulfata 0,1 mol/l, a rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

6. Posebni postupci

6.1. Kod hrane za životinje koja je bogata melasom i drugih vrsta hrane za životinje koje nisu posebno homogene, izmjeri se 20g uzorka i prenese sa 500 ml vode u sud zapremine 1 l, miješa se 1 sat na rotacionoj mješalici, a rastvor se izbistri reagensima Carrez I (tačka 3.2.) i II (tačka 3.3.), u skladu sa tačkom 5.1., ovaj put sa četvorstrukom količinom svakog reagensa i tikvica se dopuni do oznake etanolom 80% (v/v).

Homogenizuje se i filtrira, a etanol se ukloni u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela, ako nema dekstriniranog skroba, dopuni se destiliranom vodom do oznake.

6.2. Kod melasa i sirovina za hranu za životinje bogatih šećerom i gotovo potpuno bez skroba (rogač, sušeni rezanci šećerne repe itd.), izmjeri se 5 g i prenese u sud zapremine 250 ml, doda se 200 ml destilirane vode i miješa na rotacionoj mješalici jedan sat ili prema potrebi više.

Rastvor se izbistri reagensima Carrez I (tačka 3.2.) i II (tačka 3.3.), u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela i dopuni se hladnom vodom do oznake, homogenizuje i filtrira, a za određivanje količine ukupnih šećera nastavlja se postupkom iz tačke 5.3. ovog dijela

7. Napomene

7.1. Za sprječavanje pjenušanja preporučuje se prije ključanja sa Luff-Schoorl-ovim reagensom dodati (bez obzira na zapreminu) približno 1 ml 3-metilbutan-1-ola (tačka 3.14.).

7.2. Razlika između sadržaja ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza, i sadržaja redukujućih šećera, iskazanih kao glukoza, pomnoženo sa 0,95, daje procentni sadržaj saharoze.

7.3. Za određivanje sadržaja redukujućih šećera, osim laktoze, mogu se koristiti dvije metode:

8.3.1. Za približan rezultat, sadržaj laktoze, određen drugom analitičkom metodom, pomnoži se sa 0,675, a dobijeni rezultat oduzme od sadržaja redukujućih šećera.

8.3.2. Za tačan rezultat redukujućih šećera, osim laktoze, mora se koristiti isti uzorak za dva konačna postupka određivanja.

Jedna analiza se izvodi na dijelu rastvora dobijenog postupkom iz tačke 5.1. ovog dijela, druga na dijelu rastvora dobijenog pri određivanju laktoze metodom utvrđenom za tu svrhu (nakon fermentisanja drugih vrsta šećera i bistrjenja). U oba slučaja količina šećera određuje se Luff-Schoorl-ovom metodom i izračunava u mg glukoze, a jedna vrijednost se oduzme od druge i razlika iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

Primjer:

Dvije korišćene zapremine odgovaraju, za svaki postupak određivanja, uzorku od 250 mg.

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

Razlika je 16,6 mg glukoze.

Sadržaj redukujućih šećera (osim laktoze), izračunat kao glukoza, dakle iznosi:

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

**Tabela vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa
ml Na₂S₂O₃ 0,1 mol/l, dva minuta zagrijavanja, 10 minuta ključanja**

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertovani šećeri C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

Dio XI ODREĐIVANJE LAKTOZE

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa laktoze u hrani za životinje koja sadrži više od 0,5% laktoze vrši se sljedećom metodom.

2. Princip

Šećeri se rastvore u vodi, a rastvor se fermentiše kvascem vrste *Saccharomyces cerevisiae* koji ne mijenja laktozu, a nakon bistrenja i filtriranja, sadržaj laktoze u filtratu određuje se Luff-Schoorl-ovom metodom.

3. Reagensi

3.1. Suspenzija kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*: rastvori se 25 g svježeg kvasca u 100 ml vode. Suspenzija se može koristiti najduže jednu nedelju ukoliko se drži u frižderu

3.2. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata Zn(CH₃COO)₂·xH₂O i 3 g glacijalne sirćetne kiseline i dopuni se vodom do 100 ml.

3.3. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida K₄Fe(CN)₆·x3H₂O. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Luff-Schoorl-ov reagens:

Uz oprezno miješanje, u rastvor natrijum karbonata (tačka 3.4.2.) ulije se rastvor limunske kiseline (tačka 3.4.3.), doda se rastvor bakar sulfata (tačka 3.4.1.) i dopuni vodom do 1 litra, ostavi se preko noći i filtrira.

Provjeri se koncentracija tako dobijenog reagensa (Cu 0,05 mol/l, Na₂CO₃ 1 mol/l), a pH vrijednost rastvora je približno 9,4.

3.4.1. Rastvor bakar sulfata: u 100 ml vode rastvori se 25 g bakar sulfata CuSO₄·x5H₂O koji ne sadrži gvožđe.

3.4.2. Rastvor natrijum karbonata: u približno 300 ml tople vode rastvori se 143,8 g bezvodnog natrijum karbonata i ostavi se da se ohladi.

3.4.3. Rastvor limunske kiseline: u 50 ml vode rastvori se 50 g limunske kiseline C₆H₈O₇·xH₂O.

3.5. Plovućac u zrnju, prokuvan u hlorovodoničnoj kiselini, ispran i osušen.

3.6. Kalijum jodid, rastvor 30% (m/v).

3.7. Sumporna kiselina, 3 mol/l.

3.8. Rastvor natrijum tiosulfata, 0,1 mol/l.

3.9. Rastvor skroba: u litar vrele vode doda se suspenzija 5 g rastvorljivog skroba u 30 ml vode i ostavi se da vri tri minuta, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

4. Oprema

Vodeno kupatilo sa termostatom postavljenim na 38–40° C

5. Postupak

Izmjeri se 1 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Doda se 25 – 30 ml vode, sud se uroni u ključalo vodeno kupatilo i u njemu ostavi 30 minuta, zatim se ohladi na približno 35 °C i doda se 5 ml suspenzije kvasca (tačka 3.1.) i homogenizuje.

Sud se ostavi 2 sata u vodenom kupatilu na temperaturi 38–40° C i ohladi se na približno 20° C.

Doda se 2,5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.2.) i miješa 30 sekundi, zatim 2,5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.3.) i ponovo miješa 30 sekundi i dopuni se vodom do 100 ml, promiješa i filtrira. Dio filtrata ne veći od 25 ml, koji poželjno sadrži 40 do 80 mg laktoze, pipetom se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 300 ml, a prema potrebi se dopuni vodom do 25 ml.

Na isti način sprovodi se slijepa proba sa 5 ml suspenzije kvasca (tačka 3.1.). Sadržaj laktoze se određuje Luff-Schoorl-ovom metodom na sljedeći način: doda se tačno 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa (tačka 3.4.) i dva zrna plovućca (tačka 3.5.), uz ručno miješanje zagrijava se iznad otvorenog plamena srednje jačine tako da tečnost proključa za približno dva minuta. Erlenmeyerova tikvica se odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom sa otvorom prečnika 6 cm, ispod kojeg se upali plamen, plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice, na Erlenmeyerovu tikvicu se priključi kondenzator sa povratnim protokom, ostavi se da ključa tačno 10 minuta i odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titruje na sljedeći način:

Doda se 10 ml rastvora kalijum jodida (tačka 3.6.) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenjenja) 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.7.). Titruje se rastvorom natrijum tiosulfata (tačka 3.8.) do pojave mutno žute boje, doda se indikator skrob (tačka 3.9.) i dovrši titracija.

Ista titracija se izvrši bez ključanja na tačno izmjerenoj smješi 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa (tačka 3.4.) i 25 ml vode, nakon dodavanja 10 ml rastvora kalijum jodida (tačka 3.6.) i 25 ml sumporne kiseline (tačka 3.7.).

6. Izračunavanje rezultata

Iz tablice se odredi količina laktoze u mg koja odgovara razlici između dvije titracije, iskazane u ml natrijum tiosulfata 0,1 mol/l.

Rezultat se iskazuje kao procenat sadržaja bezvodne laktoze u uzorku.

7. Napomena

Za proizvode koji sadrže više od 40% fermentisanog šećera koristi se više od 5 ml suspenzije kvasca (tačka 3.1.).

U hrani za životinje sa smanjenim učešćem laktoze (npr. mlijeko za mačke) laktoza se pretvara u fruktozu, koja se ne fermentše potpuno u roku od 2 sata i zbog toga se dobiju viši ili lažno pozitivni rezultati (jer ostaci fruktoze ostaju u ekstraktu).

**Tabela vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa
ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l, dva minuta zagrijavanja, 10 minuta ključanja**

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertirani šećeri $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0	4,1	94,6		23

Dio XII ODREĐIVANJE SKROBA POLARIMETRIJSKA METODA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa skroba i visokomolekularnih produkata razgradnje skroba u hrani za životinje, za provjeru usklađenosti sa deklarisanom energetsom vrijednošću vrši se prema sljedećoj metodi.

Ovu metodu treba primjenjivati za određivanje sadržaja skroba pri izračunavanju energetske vrijednosti hrane za životinje.

Ako se sadržaj skroba određuje za druge svrhe, mogu se koristiti druge analitičke metode.

2. Princip

Metoda iz tačke 1 ovog dijela obuhvata dva postupka određivanja.

U prvom postupku se uzorak obrađuje razblaženom hlorovodoničnom kiselinom, a nakon bistrenja i filtriranja, polarimetrijom se izmjeri optička rotacija rastvora.

U drugom postupku se uzorak ekstrahuje sa 40 %-tnim etanolom, a nakon zakiseljavanja filtrata hlorovodoničnom kiselinom, bistrenja i filtriranja, izmjeri se optička rotacija na isti način kao u prvom postupku određivanja.

Razlika između dva mjerenja, pomnožena sa poznatim faktorom, daje sadržaj skroba u uzorku.

3. Reagensi

3.1. Hlorovodonična kiselina, rastvor 25% (m/m), gustina: 1,126 g/ml.

3.2. Hlorovodonična kiselina, rastvor 1,13 % (m/m).

Koncentracija se mora provjeriti titracijom sa rastvorom natrijum hidroksida 0,1 mol/l u prisustvu metil crvenog 0,1% (m/v) u etanolu 94% (v/v). Za neutralizaciju 10 ml potrebno je 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g glacijalne sirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.4. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.

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

4. Oprema

4.1. Erlenmeyerova tikvica zapremine 250 ml sa šlifom i povratnim hlađenjem.

4.2. Polarimetar ili saharimetar.

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

Uzorak se usitni tako da sve čestice mogu proći kroz sito sa okruglim otvorima prečnika 0,5 mm.

5.2. Određivanje ukupne optičke rotacije (P ili S)

Izmjeri se 2,5 g usitnjenog uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml i doda se 25 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.2.), promućka tako da se uzorak za ispitivanje ravnomjerno raspodijeli i doda još 25 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.2.).

Sud se potopi u ključalo vodeno kupatilo i prva 3 minuta snažno i ravnomjerno mućka kako bi se spriječilo nastajanje aglomerata.

U vodenom kupatilu mora biti toliko vode da kada se u njega potopi sud kupatilo ostane na tački ključanja, a tikvica se tokom mućkanja ne smije vaditi iz kupatila, a nakon tačno 15 minuta, sud se izvadi iz kupatila, doda se 30 ml hladne vode i odmah ohladi na 20° C.

Doda se 5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.3.) i mućka približno 30 sekundi, zatim se doda 5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.4.) i ponovo mućka 30 sekundi i dopuni se vodom do oznake, promiješa i filtrira, a ako filtrat nije potpuno bistar (što se rijetko događa), ponovi se postupak određivanja uz korišćenje veće količine rastvora Carrez I i II, na primjer 10 ml.

Polarimetrom ili saharimetrom se izmjeri optička rotacija rastvora u epruveti zapremine 200 ml.

5.3. Određivanje optičke rotacije (P' ili S') materije rastvorljivih u etanolu 40 %

Izmjeri se 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg, prenese u sud zapremine 100 ml i doda približno 80 ml etanola (tačka 3.5.).

Sud se ostavi 1 sat na sobnoj temperature, u tom vremenskom periodu se šest puta snažno promućka kako bi se uzorak za ispitivanje potpuno izmiješao sa etanolom. Dopuni se etanolom (tačka 3.5.) do oznake, promiješa i filtrira.

Pipetom se prenese 50 ml filtrata (što odgovara količini od 2,5 g uzorka) u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 250 ml, doda se 2,1 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.) i snažno promućka, a kondenzator sa povratnim protokom se priključi na Erlenmeyerovu tikvicu i uroni u ključalo vodeno kupatilo i nakon 15 minuta, Erlenmeyerova tikvica se izvadi iz kupatila, a njen sadržaj prenese u sud zapremine 100 ml, ispere sa malo hladne vode i ohladi na 20° C.

Izbistri se rastvorom Carrez I (tačka 3.3.) i II (tačka 3.4.), dopuni vodom do oznake, promiješa i filtrira, a zatim se izmjeri optička rotacija, u skladu sa tačkom 5.2. ovog dijela.

6. Izračunavanje rezultata

Sadržaj škroba (%) izračunava se na sljedeći način:

6.1. Mjerenje polarimetrom

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

P - ukupna optička rotacija u ugaonim stepenima

P' - optička rotacija materija rastvorljivih u 40% (v/v) etanolu, u ugaonim stepenima

$\alpha_D^{20^\circ}$ - specifična optička rotacija čistog škroba. Brojne vrijednosti koje se smatraju uobičajeno prihvaćenima za ovaj faktor su:

+185,9°:	pirinčani škrob;
+185,7°:	krompirov škrob;
+184,6°:	kukuruzni škrob;
+182,7°:	pšenični škrob;
+181,5°:	ječmeni škrob;
+181,3°:	ovseni škrob;
+184,0°:	druge vrste škroba i škrobnih smješa u krmnim smjesama

6.2 Mjerenje saharometrom

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

gdje je:

S - ukupna optička rotacija u stepenima saharometra

S' - optička rotacija materija rastvorljivih u 40%-tnom etanolu (v/v), u stepenima saharometra

N - masa (g) saharoze u 100 ml vode pri kojoj je optička rotacija 100 saharometarskih stepeni, kada se mjeri upotrebom epruvete od 200 mm

- 16,29 g za francuske saharometre
- 26,00 g za njemačke saharometre
- 20,00 g za mješovite saharometre.

$\alpha_D^{20^\circ}$ - specifična optička rotacija čistog škroba.

6.3. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći 0,4 apsolutne vrijednosti za sadržaj škroba niži od 40% i 1% relativne vrijednosti za sadržaj škroba jednak ili veći od 40%.

7. Napomene

7.1. Ako uzorak sadrži više od 6% karbonata, izraženih kao kalcijum karbonat, prije određivanja ukupne optičke rotacije, se moraju razoriti obradom sa tačno potrebnom količinom razblažene sumporne kiseline.

7.2. Kod proizvoda sa visokim sadržajem laktoze, poput mliječnog seruma u prahu ili obranog mlijeka u prahu, nakon dodavanja 80 ml etanola (tačka 3.5.) postupa se na sljedeći način.

Na tikvicu se priključi kondenzator sa povratnim protokom i tikvica se 30 minuta drži potopljena u vodenom kupatilu na 50 °C i ostavi se da se ohladi i nastavi postupak iz tačke 5.3. ovog dijela.

7.3 Sirovine za hranu za životinje, koje su prisutne u znatnoj količini u hrani za životinje, uzrokuju smetnje pri određivanju sadržaja škroba polarimetrijskom metodom, što može dovesti do neispravnih rezultata:

- proizvodi od šećerne repe, poput suvih rezanaca šećerne repe, melase šećerne repe, melasiranih rezanaca šećerne repe, vinase šećerne repe, šećera od šećerne repe,
- pulpa citrusa,
- sjemenke lana; pogača od sjemenki lana; sačma od sjemenki lana,
- sjeme uljane repice; pogača uljane repice; sačma uljane repice; ljuske uljane repice,
- sjemenke suncokreta; sačma od sjemenki suncokreta; sačma od djelimično oljuštenih sjemenki suncokreta,
- pogača od kokosa, sačma kokosa,
- pulpa krumpira,
- suvi kvasac,
- proizvodi sa visokim sadržajem inulina (npr. komadi i brašno od čičoke, lat. *Heliathus tuberosus*),
- čvarci
- proizvodi od soje.

DIO XIII ODREĐIVANJE SIROVOG PEPELA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje sadržaja sirovog pepela u hrani za životinje vrši se sljedećom metodom.

1. Princip

Uzorak se spali na 550 °C; ostatak se izmjeri.

2. Reagensi

Amonijum nitrat, 20%-tna (m/v).

3. Oprema

3.1. Grejna ploča.

3.2. Električna mufolna peč sa termostatom.

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

4. Postupak

Izmjeri se približno 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg (2,5 g kod proizvoda koji lako nabubre) i prenese u lončić za spaljivanje koji se prethodno zagrije na 550 °C, ohladi i tarira. Lončić se postavi na grejnu ploču i postepeno zagrijava sve dok materija ne pocrni i spali se u skladu sa tač. 5.1. ili 5.2. ovog dijela.

4.1. Lončić se postavi u kalibrisanu mufolnu peč zagrijanu na 550 °C i ostavi se na toj temperaturi sve do nastanka bijelog, svijetlo-sivog ili crvenkastog pepela koji izgleda kao da ne sadrži karbonatne čestice.

Lončić se postavi u eksikator, ostavi se da se ohladi i odmah izmjeri.

4.2. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peč zagrijanu na 550° C.

U peći se spaljuje tri sata, a lončić se postavi u eksikator, ostavi se da se ohladi i odmah izmjeri i ponovo se 30 minuta spaljuje kako bi se obezbjedilo da je masa pepela konstantna (gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne smije preći 1 mg).

5. Izračunavanje rezultata

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara.

Rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

6. Napomene

6.1. Materije koje se teško spaljuju moraju se izložiti prvom spaljivanju u trajanju od najmanje tri sata, zatim se ohlade i dodaje im se nekoliko kapi 20%-tnog rastvora amonijum nitrata ili vode (oprezno, kako bi se spriječilo raspršavanje pepela ili nastanak grudvi).

Nakon sušenja u sušnici nastavi se sa spaljivanjem, a postupak se prema potrebi ponavlja, sve do potpunog spaljivanja.

6.2. Kod materija koje su otporne na obradu iz tačke 7.1. ovog dijela, postupa se na sljedeći način:

- nakon trosatnog spaljivanja, pepeo se prenese u toplu vodu i filtrira kroz mali filter bez pepela;

- filter i njegov udio se spale u istom lončiću, a filtrat se prenese u ohlađen lončić, osuši, spali i izmjeri.

6.3. Kod ulja i masti, tačno se izmjeri 25 g u lončić odgovarajuće veličine, karbonizuje se tako da se materija zapali trakom od filter papira bez pepela, a nakon spaljivanja navlaži se što je moguće manjom količinom vode, osuši se i spali u skladu sa tačkom 5 ovog priloga.

Dio XIV ODREĐIVANJE PEPELA NERASTVORLJIVOG U HLOROVODONIČNOJ KISJELINI

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa mineralnih materija u hrani za životinje, nerastvorljivih u hlorovodoničnoj kiselini vrši se sljedećim metodama.

1.1. *Metoda A:* primjenjuje se za organske sirovine za hranu za životinje i većinu krmnih smješa.

1.2. *Metoda B:* primjenjuje se za mineralne krmne smješe i krmne smješe koje, prema metodi A, sadrže više od 1% materija nerastvorljivih hlorovodoničnoj kiselini.

2. Princip

2.1. *Metoda A:* uzorak se spali, pepeo se rastvori u vreloj hlorovodoničnoj kiselini, a nerastvorljivi ostatak se filtrira i izmjeri.

2.2. *Metoda B:* uzorak se obradi hlorovodoničnom kiselinom, rastvor se filtrira, ostatak spali, a tako dobijeni pepeo obradi u skladu s metodom A.

3. Reagensi

3.1. Hlorovodonična kiselina, 3 mol/l.

3.2. Trihlorsirćetna kiselina, rastvor 20% (m/v).

3.3. Trihlorsirćetna kiselina, rastvor 1% (m/v).

4. Oprema

4.1. Grejna ploča.

4.2. Električna mufolna peč sa termostatom.

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

4.4. Filter bez pepela

5. Postupak

5.1. Metoda A

Uzorak se spali u skladu sa metodom za određivanje sirovog pepela, a može se koristiti i pepeo dobijen tokom analize.

Pepeo se prenese u čašu zapremine 250 ml do 400 ml sa 75 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.), polako se zagrije do ključanja i petnaest minuta ostavi lagano da ključa. Topli rastvor se filtrira kroz papir za filtriranje bez pepela, ostatak se ispire toplom vodom sve do prestanka kisjele reakcije, a filter sa ostatkom i pepelom se osuši u tariranom lončiću za spaljivanje na 550–700° C i ohladi se u eksikatoru i izmjeri.

5.2. Metoda B

Izmjeri se 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg, prenese u čašu zapremine 250 ml do 400 ml i doda se 25 ml vode, zatim 25 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.), promiješa i pričekava da prestane izdavanje mješurova gasa, zatim se doda se još 50 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.) i pričekava se dok potpuno ne prestane izdavanje gasa, zatim se čaša stavi u ključalo vođeno kupatilo i tamo drži 30 minuta ili prema potrebi duže kako bi se potpuno hidrolizovao sav eventualno prisutan skrob.

Sadržaj se filtrira dok je topao kroz filter bez pepela, a filter se ispire sa 50 ml tople vode, zatim se filter koji sadrži ostatak prenese se u lončić za spaljivanje, osuši i spali na 550–700° C, a pepeo se prenese u čašu zapremine 250 ml do 400 ml sa 75 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.) i nastavlja se postupak u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela.

6. Izračunavanje rezultata

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara. Rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

7. Napomene

Ako pri filtriranju nastanu poteškoće, analiza se ponovi, pri čemu se 50 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.) zamijeni sa 50 ml trihlorsirćetne kiseline 20% (tačka 3.2.), a filter ispire toplim rastvorom trihlorsirćetne kiseline 1% (tačka 3.3)

Dio XV ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA

Ukupni fosfor određuje se :

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, gvožđa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, sumpora, gvožđa, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod pritiskom, ili
- fotometrijskom metodom, kako je opisano u nastavku.

FOTOMETRIJSKA METODA

Ova metoda omogućava određivanje ukupnog učešća fosfora u hrani za životinje. Naročito je primjerena za analizu proizvoda s niskim učešćem fosfora. U nekim se slučajevima (kod proizvoda bogatih fosforom) može primijeniti i gravimetrijska metoda

1. Princip

Uzorak se mineralizuje bilo suvim spaljivanjem (kod organske hrane za životinje) bilo digestijom kiselinom (kod mineralnih mješavina i tečne hrane za životinje) i prenese u kiseli rastvor.

Rastvor se obradi molibdovanadatnim reagensom, a optička gustina tako dobijenog žutog rastvora mjeri se spektrofotometrom na 430 nm.

2. Reagensi

2.1. Kalcijum karbonat.

2.2. Hlorovodonična kiselina, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (približno 6 mol/l).

2.3. Azotna kiselina, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

2.4. Azotna kiselina, $\rho_{20} = 1,38$ do 1,42 g/ml.

2.5. Sumporna kiselina, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

2.6. Molibdovanadatni reagens: u sudu zapremine 1 l pomiješa se 200 ml rastvora amonijum heptamolibdata (tačka 3.6.1.), 200 ml rastvora amonijum monovanadata (tačka 3.6.2.) i 134 ml azotne kiseline (tačka 3.4.), dopuni se vodom do oznake.

2.6.1. Rastvor amonijum heptamolibdata: u vrućoj vodi se rastvori 100 g amonijum heptamolibdata ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), doda se 10 ml amonijaka (gustina 0,91 g/ml) i dopuni vodom do 1 litra.

2.6.2. Rastvor amonijum monovanadata: u 400 ml vruće vode rastvori se 2,35 g amonijum monovanadata (NH_4VO_3). Uz stalno miješanje polako se dodaje 20 ml razblažene azotne kiseline (7 ml HNO_3 (tačka 3.4.) + 13 ml H_2O) i dopuni vodom do 1 litra.

3.7 Standardni rastvor 1 mg fosfora na ml: u vodi se rastvori 4,387 g kalijum dihidrogen fosfata (KH_2PO_4). Dopuni se vodom do 1 litra.

3. Oprema

3.1. Lončići za spaljivanje od kvarcnog stakla, porculana ili platine.

3.2. Električna mufolna peč sa termostatom postavljenim na 550 °C.

3.3. Tikvica po Kjeldahl-u zapremine 250 ml.

3.4. Sudovi i precizne pipete.

3.5. Spektrofotometar

3.6. Epruvete prečnika približno 16 mm, sa brušenim čepovima prečnika 14,5 mm, zapremine 25 – 30 ml.

4. Postupak

4.1. Priprema rastvora

Rastvor se priprema u skladu sa tač. 5.1.1. ili 5.1.2. ovog dijela u zavisnosti od prirode uzorka.

4.1.1. Standardni postupak

Izmjeri se 1 g uzorka ili više sa preciznošću od 1 mg, a uzorak se prenese u tikvicu po Kjeldahl-u, doda se 20 ml sumporne kiseline (tačka 3.5.) i promućka kako bi se uzorak u potpunosti natopio kiselinom i spriječilo njegovo prijanjanje na zidove tikvice, zatim se zagrije i ostavi da ključa 10 minuta.

Ostavi se da se ohladi, doda se 2 ml azotne kiseline (tačka 3.4.), lagano se zagrije, malo se ohladi, doda se još malo azotne kiseline (tačka 3.4.) i ponovo zagrije do ključanja. Postupak se ponavlja sve dok se ne dobije bezbojni rastvor i ohladi se, doda malo vode, tečnost se odlije u sud zapremine 500 ml, a tikvica po Kjeldahl-u ispere vrućom vodom, ostavi se da se ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizuje i filtrira.

4.1.2. Uzorci koji sadrže organske materije i ne sadrže kalcijumove i magnezijumove dihidrogen fosfate

Izmjeru se i prenese u lončić za spaljivanje 2,5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i doda se 1 g kalcijum karbonata (tačka 3.1.) i miješa dok se materija u potpunosti ne izmiješa.

Spaljuje se u peći na 550 °C do nastanka bijelog ili sivog pepela (mala količina uglja ne predstavlja problem), a pepeo se prenese u čašu zapremine 250 ml. Doda se 20 ml vode i hlorovodonične kiseline (tačka 3.2.) sve dok ne prestane pjenušanje. Doda se još 10 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.2.). Čaša se stavi u pješćano kupatilo i ostavi da sadržaj ispari do suva, kako bi kvarcni pijesak postao nerastvorljiv. Ostatak se ponovo rastvori u 10 ml azotne kiseline (tačka 3.3.) i ostavi da ključa 5 minuta u pješćanom kupatilu ili na grejnoj ploči, ali da ne ispari potpuno. Tečnost se odlije u sud zapremine 500 ml, čaša se više puta ispere vrućom vodom. Ostavi se da se ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizuje i filtrira.

4.2. Nastanak obojenja i mjerenje optičke gustine

Alikvot filtrata iz tačke 5.1.1. ili 5.1.2. razblaži se do koncentracije fosfora ne veće od 40 µg/ml. U epruvetu (tačka 4.6.) se prenese 10 ml tog rastvora i doda 10 ml molibdovanadatnog reagensa (tačka 3.6.). Homogenizuje se i ostavi najmanje 10 minuta na 20 °C. Spektrofotometrom se izmjeri optička gustina na 430 nm upoređivanjem sa rastvorom dobijenim dodavanjem 10 ml molibdovanadatnog reagensa (tačka 3.6.) u 10 ml vode.

4.3. Kalibraciona kriva

Od standardnog rastvora (tačka 3.7.) naprave se rastvori koje sadrže 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosfora na ml. Uzme se po 10 ml od svakog rastvora i doda 10 ml molibdovanadatnog reagensa (tačka 3.6.). Homogenizuje se i ostavi najmanje 10 minuta na 20 °C. Izmjeri se optička gustina u skladu sa tačkom 5.2. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustine odgovarajućih količina fosfora. Za koncentracije u rasponu od 0 – 40 µg/ml kriva je linearna.

5. Izračunavanje rezultata

Količina fosfora u oglednom uzorku određuje se iz kalibracione krive.

Rezultat se prikazuje kao procentni sadržaj uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći:

- 3% većeg rezultata, ako je sadržaj fosfora niži od 5%,
- 0,15% apsolutne vrijednosti, ako je sadržaj fosfora 5% ili više.

Dio XVI ODREĐIVANJE HLORA IZ HLORIDA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje količine hlora u hloridima rastvorljivim u vodi koji se uobičajeno izražavaju kao natrijum hlorid u suvoj hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi.

2. Princip

Hloridi se rastvore u vodi. Ako proizvod sadrži organske materije, koristi se postupak bistrenja. Rastvor se lagano zakiseli azotnom kiselinom, a hloridi istalože u obliku srebro hlorida, upotrebom rastvora srebro nitrata. Višak srebro nitrata titruje se rastvorom amonijum tiocijanata po Volhard-voj metodi.

3. Reagensi

3.1. Rastvor amonijum tiocijanata, 0,1 mol/litra.

3.2. Rastvor srebro nitrata, 0,1 mol/l.

3.3. Zasićeni rastvor amonijum-gvožđe sulfata $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.

3.4. Azotna kiselina, gustina: 1,38 g/ml.

3.5. Dietileter.

3.6. Aceton.

3.7. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ i 3 g glacialnesirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.8. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.

3.9. Aktivni ugalj koji ne sadrži hloride niti ih apsorbuje.

4. Oprema

Mješalica (rotaciona): približno 35 do 40 obr/min.

5. Postupak

5.1. Priprema rastvora

Rastvor se priprema u skladu sa tač. 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3. ovog dijela u zavisnosti od prirode uzorka.

Istovremeno se izvodi slijepa proba bez uzorka koji se analizira.

5.1.1. Uzorci bez organskih materija

Izmjeri se najviše 10 g uzorka koji sadrži najviše 3 g hlora u obliku hlora sa preciznošću od 1 mg. Prenese se u sud zapremine 500 ml sa 400 ml vode na približno 20° C. Miješa se 30 minuta na rotacionoj mješalici, dopuni do oznake, homogenizuje i filtrira.

5.1.2. Uzorci koji sadrže organske materije, osim proizvoda iz tačke 5.1.3.

Izmjeri se približno 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese zajedno sa 1 g aktivnog uglja u sud zapremine 500 ml. Doda se 400 ml vode temperature približno 20° C i 5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.7.), miješa se 30 sekundi i doda 5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.8.). Miješa se 30 minuta na rotacionoj mješalici, dopuni do oznake, homogenizuje i filtrira.

5.1.3. Kuvana hrana za životinje, lanene pogače i brašno, proizvodi bogati lanenim brašnom i drugi proizvodi bogati sluzima ili koloidnim materijama (na primjer, dekstrinirani skrob)

Rastvor se priprema u skladu sa tačkom 5.1.2. ovog dijela, ali se ne filtrira. Dekantuje se (prema potrebi centrifugira), uzme se 100 ml supernatanta i prenese u sud zapremine 200 ml. Pomiješa se sa acetonom (tačka 3.6.) i sa tim rastvorom dopuni do oznake, homogenizuje i filtrira.

5.2. Titracija

Pipetom se u Erlenmeyerovu tikvicu prenese 25–100 ml filtrata (uzimajući u obzir pretpostavljeni sadržaj hlora) dobijenog postupkom iz tačke 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3. Alikvoтни dio ne smije sadržati više od 150 mg hlora (Cl). Prema potrebi se razblaži vodom na najmanje 50 ml, doda se 5 ml azotne kiseline (tačka 3.4), 20 ml zasićenog rastvora amonijum-gvožđe sulfata (tačka 3.3.) i 2 kapi rastvora amonijum tiocijanata (tačka 3.1.), koji se prenese iz birete napunjene do nulte oznake. Biretom se prenese rastvor srebro nitrata (tačka 3.2.) tako da nastane 5 ml viška. Doda se 5 ml dietiletra (tačka 3.5.) i dobro promućka tako da se talog zgruša. Višak srebro nitrata titruje se rastvor amonijum tiocijanata (tačka 3.1.) sve dok crvenkasto-smeđe obojenje ne potraje 1 minut.

6. Izračunavanje rezultata

Količina hlora (X), izražena kao procentni sadržaj natrijum hlora, izračunava se prema sljedećoj formuli:

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

gdje je:

V_1 - ml dodatog rastvora srebro nitrata 0,1 mol/l;

V_2 - ml rastvora amonijum tiocijanata 0,1 mol/l korišćenog za titraciju;

m - masa uzorka

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

7. Napomene

7.1 Titracija se može izvesti i potencijometrijskom titracijom.

7.2 Proizvodi bogati uljima i mastima prvo se odmaste dietileterom ili petrol etrom.

7.3 Kod ribljeg brašna, titracija se može izvesti Mohr-ovom metodom.

METODE ZA KONTROLU KOLIČINE ODOBRENIH DODATAKA HRANI ZA ŽIVOTINJE

Dio I

ODREĐIVANJE VITAMINA A

Vitamin A određuje se:

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

Napomena:

Analitička metoda utvrđena u standardu EN 17547 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje vitamina A i E umjesto metode opisane u dijelu I ovog Priloga za određivanje vitamina A i dijelu II ovog Priloga za određivanje vitamina E.

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa vitamina A (retinola) u hrani za životinje i premiksima vrši se u skladu sa sljedećom metodom. Vitamin A uključuje trans-retinil alkohol i njegove cis izomere koji se određuju ovom metodom. Sadržaj vitamina A izražava se u međunarodnim jedinicama (IU) na kg. Jedna IU odgovara djelovanju 0,300 µg *trans*-vitamin A alkohola ili 0,344 µg *trans*-vitamin A acetata ili 0,550 µg *trans*-vitamin A palmitata.

Granica kvantifikacije je 2000 IU vitamina A/kg.

2. Princip

Uzorak se hidrolizuje rastvorom etanol kalijum hidroksida, a vitamin A se ekstrahuje petrol etrom. Rastvor se ukloni uparavanjem, a ostatak rastvori u metanolu i prema potrebi razblaži do tražene koncentracije. Sadržaj vitamina A se određuje reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokoh performansi (RP-HPLC) sa UV ili fluorescentnim detektorom. Odaaberu se hromatografski parametri koji omogućavaju da se *trans*-vitamin A alkohol i njegovi cis izomeri ne razdvoje.

3. Reagensi

3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$.

3.2. Petrol etar, raspon tačke klučanja 40–60° C.

3.3. Metanol.

3.4. Rastvor kalijum hidroksida, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$.

3.5. Rastvor natrijum askorbata, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$.

3.6. Natrijum sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).

3.6.1. Rastvor natrijum sulfida, $c = 0,5\text{ mol/l}$ u glicerolu, $\beta = 120\text{ g/l}$ (za $x = 9$).

3.7. Rastvor fenoltaleina, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ u etanolu (tačka 3.1.).

3.8. 2-propanol.

3.9. Mobilna faza za HPLC: smješa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v+v). Tačan odnos određuje se u skladu sa osobinama korišćene kolone.

3.10. Azot, bez kiseonika.

3.11. *Trans*-vitamin A acetat, posebne čistoće, sertifikovane aktivnosti, npr. $2,80 \times 10^6\text{ IU/g}$.

3.11.1. Osnovni rastvor *trans*-vitamin A acetata: izmjeri se 50 mg acetat vitamina A (tačka 3.11.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u 2-propanolu (tačka 3.8.) i dopuni istim rastvorom do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora iznosi 1400 IU vitamina A na ml. Tačan sadržaj se određuje u skladu sa tačkom 5.6.3.1.

3.12. *Trans*-vitamin A palmitat, posebne čistoće, sertifikovane aktivnosti, npr. $1,80 \times 10^6\text{ IU/g}$.

3.12.1. Osnovni rastvor *trans*-vitamin A palmitata: izmjeri se 80 mg palmitata vitamina A (tačka 3.12.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u 2-propanola (tačka 3.8.) i dopuni istim rastvorom do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 1400 IU vitamina A na ml. Tačan sadržaj se određuje u skladu sa tačkom 5.6.3.2.

3.13. 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (vidjeti napomenu pod tačkom 7.5)

4. Oprema

4.1. Rotacioni vakuum uparivač.

4.2. Laboratorijsko posuđe od tamnog stakla.

4.2.1. Baloni sa ravnim dnom ili konusne tikvice, zapremine 500 ml, sa brušenim vratom.

4.2.2. Sudovi sa čepovima od brušenog stakla, sa uskim vratom, zapremine 10, 25, 100 i 500 ml.

4.2.3. Lijevci za odvajanje, konusni, 1000 ml, sa čepovima od brušenog stakla.

4.2.4. Kruškaste tikvice, 250 ml, sa čepovima od brušenog stakla.

4.3. Allihn-ov kondenzator, dužine 300 mm sa nastavkom od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev gasa.

4.4. Nabrani filter papir za razdvajanje faza, prečnika 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Oprema za HPLC sa sistemom za injektiranje.

4.5.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili ekvivalentna (mjerilo efikasnosti: samo jedan pik za sve izomere retinola u uslovima za HPLC).

4.5.2. UV ili fluoroscentni detektor sa mogućnošću promjene talasne dužine.

4.6. Spektrofotometar sa kvarcnim kivetama od 10 mm.

4.7. Vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom.

4.8. Uređaj za ekstrakciju koji se sastoji od:

4.8.1. Staklenog cilindra zapremine 1 litar sa vratom i čepom od brušenog stakla.

4.8.2. Uložak od brušenog stakla sa bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz sredinu. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tečnosti u cilindru može prenijeti u lijevak za odvajanje.

5. Postupak

Napomena: Vitamin A je osjetljiv na UV svjetlost i oksidaciju. Svi postupci se izvode bez prisustva svjetlosti (u laboratorijskom posuđu od tamnog stakla ili u staklenim posudama zaštićenim aluminijumskom folijom) i kiseonika (ispira se azotom). Tokom ekstrakcije vazduh iznad tečnosti zamijeni se azotom (povremenim popuštanjem čepa izbjegava se previsoki pritisak).

5.1. Pripremanje uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine prečnika otvora 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje toplote. Mljevenje se mora izvršiti neposredno prije mjerenja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina A.

5.2. Saponifikacija

Zavisno od sadržaja vitamina A, izmjeri se 2–25 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.). Uz stalno vrtložno mijećanje, jedno za drugim dodaje se 130 ml etanola (tačka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (tačka 3.13.), 2 ml rastvora natrijum askorbata (tačka 3.5.) i 2 ml rastvora natrijum sulfida (tačka 3.6.). Na balon se spoji kondenzator (tačka 4.3.) i balon potopi u vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom (tačka 4.7.). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi uz refluks. Zatim se kroz kondenzator doda 25 ml rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.4.) i ostavi uz refluks (tačka 4.3.) sljedećih 25 minuta, uz mijećanje pod laganom strujom azota. Zatim se kondenzator ispere sa približno 20 ml vode, a sadržaj balona ohladi na sobnoj temperaturi.

5.3. Ekstrakcija

Rastvor za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantovanjem u lijevak za odvajanje zapremine 1000 ml (tačka 4.2.3.) ili u uređaj za ekstrakciju (tačka 4.8.), tako što se ispere sa ukupno 250 ml vode. Zatim se balon za saponifikaciju ispere sa 25 ml etanola (tačka 3.1.) i 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), a isprane tečnosti prenese u lijevak za odvajanje ili uređaj za ekstrakciju. Odnos vode i etanola u pomiješanim rastvorima mora biti približno 2:1. Snažno se mucka 2 minuta i zatim ostavi 2 minuta da se slegne.

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odvajanje (tačka 4.2.3.)

Kad se slojevi razdvoje, sloj petrol era se prenese u drugi lijevak za odvajanje (tačka 4.2.3.). Ekstrakcija se ponovi dva puta sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.) i dva puta sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.).

Pomiješani ekstrakti se u lijevku za odvajanje dva puta isperu sa 100 ml vode, uz lagano vrtložno miješanje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz stalno mućkanje sa dodatnim porcijama od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju rastvora fenoltaleina (tačka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani ekstrakt se filtriraju kroz suvi nabrani filter za odvajanje faza (tačka 4.4) u sud zapremine 500 ml (tačka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odvajanje i filter se isperu sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), sud se dopuni petrol etrom do oznake (tačka 3.2.) i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija uređajem za ekstrakciju (tačka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje, čep staklenog cilindra (tačka 4.8.1.) se zamijeni uloškom od brušenog stakla (tačka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi se odmah iznad nivoa povezane aparature. Pritiskom koji stvori azot u bočnoj ručici, gornji sloj petrol etra se prenese u lijevak za odvajanje zapremine 1000 ml (tačka 4.2.3.). U stakleni cilindar se doda 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), začepi i dobro promućka. Pričekava se do razdvajanja slojeva, a gornji sloj se prenese u lijevak za odvajanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), zatim dva puta sa po 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), a slojevi petrol etra dodaju se u lijevak za odvajanje.

Pomiješani ekstrakti petrol etra se isperu, u skladu sa tačkom 5.3.1., a zatim se nastavi u skladu sa navedenom tačkom.

Priprema rastvora uzorka za HPLC

Alikvotni dio rastvora petrol etra (iz tačke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu zapremine 250 ml (tačka 4.2.4.). Rastvor se upari skoro do suva u rotacionom uparivaču (tačka 4.1.) pri sniženom pritisku i temperaturi kupatila do 40° C. Dovođenjem azota uspostavi se atmosferski pritisak (tačka 3.10.), a tikvica se izvadi iz rotacionog uparivača. Preostali rastvor se upari u struji azota (tačka 3.10.), a ostatak odmah rastvori u poznatoj zapremini (10–100 ml) metanola (tačka 3.3.) (koncentracija vitamina A mora biti u rasponu od 5 do 30 IU/ml).

Određivanje HPLC-om

Vitamin A se razdvaja na koloni C₁₈ sa reverznim fazama (tačka 4.5.1.), koncentracija se izmjeri UV detektorom (325 nm) ili fluorescentnim detektorom (ekscitacija: 325 nm, emisija: 475 nm) (tačka 4.5.2.).

Alikvotni dio (npr. 20 µl) rastvora metanola dobijene u tački 5.4. se injektira i eluira mobilnom fazom (tačka 3.9.). Izračuna se srednja vrijednost visine (površine) pika za više injektiranja istog rastvora uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pikova za više injektiranja kalibracionih rastvora (tačka 5.6.2.).

Uslovi za HPLC

Za HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.5.1.):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.9.):	Smjesa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v+v)
Brzina protoka:	1–2 ml/min
Detektor (tačka 4.5.2.):	UV detektor (325 nm) ili fluorescentni detector (ekscitacija: 325 nm/emisija: 475 nm)

5.4. Kalibracija

5.4.1. Priprema radnih standardnih rastvora

Pipetom se prenese 20 ml osnovnog rastvora acetata vitamina A (tačka 3.11.1.) ili 20 ml osnovnog rastvora palmitata vitamina A (tačka 3.12.1.) u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.) i hidrolizuje u skladu sa tačkom 5.2., ali bez dodatka BHT-a. Zatim se ekstrahuje sa petrol etrom (tačka 3.2.) u skladu sa tačkom 5.3. i dopuni petrol etrom (tačka 3.2.) do 500 ml. U rotacionom uparivaču se upari 100 ml ovog ekstrakta gotovo do suva, strujom azota (tačka 3.10.) ukloni se preostali rastvor, a ostatak ponovno rastvori u 10,0 ml metanola (tačka 3.3.). Nominalna koncentracija ovog rastvora je 560 IU vitamina A na ml. Tačan sadržaj se određuje u skladu sa tačkom 5.6.3.3. Radni standardni rastvor mora se pripremiti svjež prije upotrebe. Pipetom se prenese 2,0 ml ovog radnog standardnog rastvora u sud zapremine 20 ml, dopuni metanolom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalna koncentracija takvog razblaženog radnog standardnog rastvora iznosi 56 IU vitamina A na ml.

5.4.2. Priprema kalibracionog rastvora i kalibracione krive

Prenese se 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml razblaženog radnog standardnog rastvora u seriju sudova zapremine 20 ml, dopuni metanolom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2, 8, 5, 6, 14,0 i 28,0 IU vitamina A na ml.

Više puta se injektira 20 µl svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova se konstruiše kalibraciona kriva uzimajući u obzir rezultate UV kontrole (tačka 5.6.3.3.).

5.4.3. UV standardizacija standardnih rastvora

5.4.3.1. Osnovni rastvor acetata vitamina A

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovnog rastvora acetata vitamina A (tačka 3.11.1.) u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ovog razblaženog rastvora acetata vitamina A u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm. Obračun sadržaja vitamina A:

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

($E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ za acetat vitamina A = 1530 na 326 nm u 2-propanolu)

5.4.3.2. Osnovni rastvor vitamin A palmitata

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovnog rastvora palmitata vitamina A (tačka 3.12.1.) u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ovog razblaženog rastvora palmitata vitamina A u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm. Obračun sadržaja vitamina A:

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

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

5.4.3.3. Radni standardni rastvor vitamina A

Pipetom se prenese 3,0 ml nerazblaženog radnog standardnog rastvora vitamina A, pripremljenog u skladu sa tačkom 5.6.1. ovog dijela, u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Pipetom se prenese 5,0 ml ovog rastvora u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm. Obračun sadržaja vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

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

6. Izračunavanje rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova vitamina A iz rastvora uzorka, određuje se koncentracija rastvora uzorka u IU/ml iz kalibracione krive (tačka 5.6.2.).

Sadržaj vitamina A (w) u uzorku, iskazan u IU/kg, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

c - koncentracija vitamina A (izražena u IU/ml)

V_1 - zapremina rastvora uzorka (tačka 5.4.) u ml

V_2 - zapremina alikvota korišćenog u tački 5.4. ovog dijela, u ml m - masa uzorka u gramima

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka sa niskom koncentracijom vitamina A može biti korisno sjediniti ekstrakte petrol etra iz dva nezavisna postupka saponifikacije (izmjerena količina: 25 g) u jedan rastvor uzorka za određivanje HPLC-om.

7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (tačka 3.1.) za razbijanje emulzije.

7.4. Kod ulja iz jetre bakalara i drugih čistih masti vrijeme trajanja saponifikacije treba produžiti na 45 – 60 minuta.

7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrohinon.

7.6. Izomere retinola moguće je razdvojiti uobičajenom faznom kolonom. U tom slučaju, za izračunavanje treba sabrati visine (površine) pikova svih citrans izomera.

7.7. Umjesto rastvora natrijum askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto rastvora natrijum sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Pri analizi vitamina A u dodacima mlijeka treba paziti na sljedeće:

- kod saponifikacije (tačka 5.2.): zbog količine masti u uzorku možda će trebati veća količina rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.4.),
- kod ekstrakcije (tačka 5.3.): zbog prisustva emulzija možda će trebati prilagoditi odnos voda/etanol 2:1.

Za provjeru pouzdanosti rezultata dobijenih korišćenom analitičkom metodom na ovom specifičnom matriksu (dodatak mlijeka) treba na dodatnom uzorku izvršiti test iskorišćenja. Ako je iskorišćenje manje od 80%, rezultat analize treba korigovati za iskorišćenje.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći 15% u odnosu na najviši rezultat.

9. Rezultati međulaboratorijske studije

	Predsmješa	Gotove predsmješe za ishranu životinja	Mineralni koncentrat	Proteinska hrana za životinje	Hrana za prasiće
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
srednja vrijednost [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [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
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R [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
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L - broj laboratorija

n - broj pojedinačnih vrijednosti

s_r - standardna devijacija ponovljivosti

s_R - standardna devijacija obnovljivosti

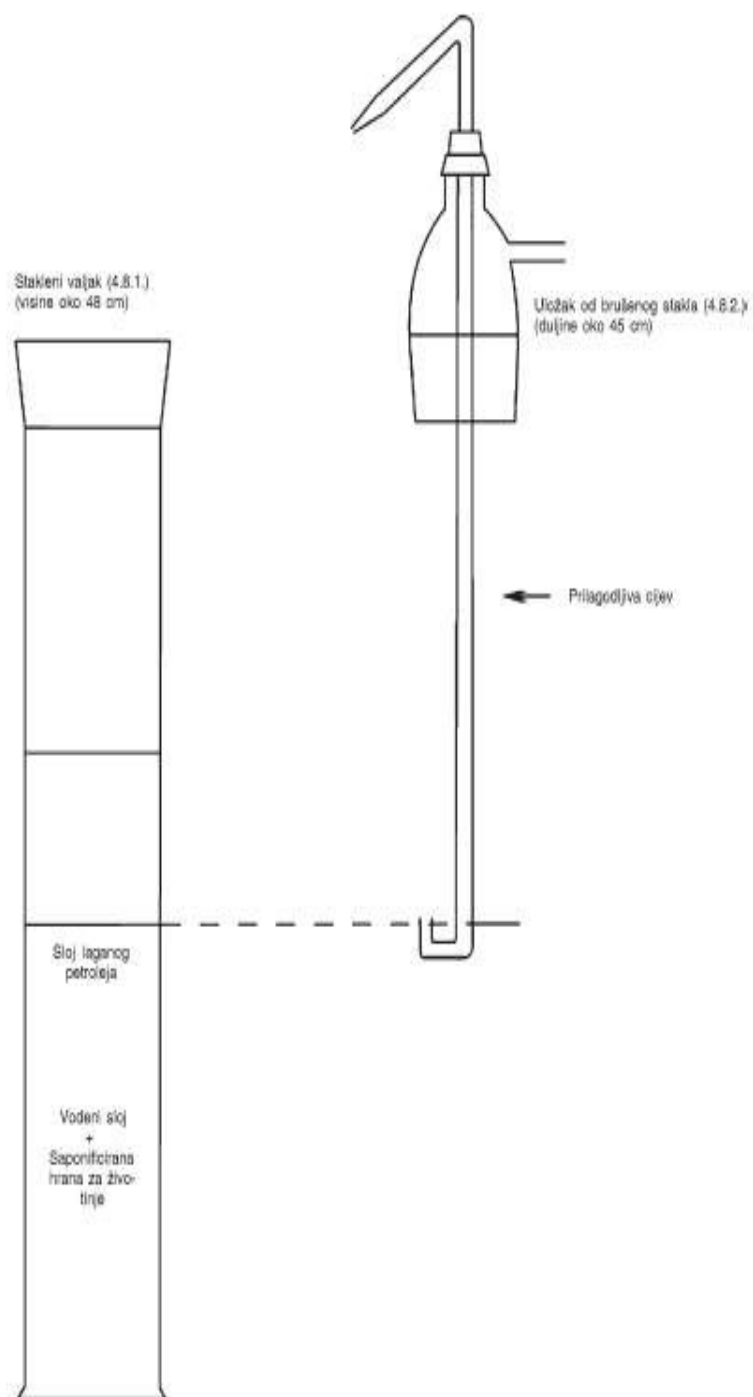
r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



Dio II ODREĐIVANJE VITAMINA E

Vitamin E određuje se:

— analitičkom metodom utvrđenom u standard EN 17547 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje sadržaja vitamina A, E i D – Pročišćavanje metodom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE) i metodom tečne hromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), ili
— tečnom hromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (RP-HPLC) uz upotrebu UV ili fluorescentnog detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 9.

Napomena:

Analitička metoda utvrđena u standardu EN 17547 navodi se kao zamjenska metoda koja se upotrebljava za potrebe službenih kontrola za određivanje vitamina A i E umjesto metode opisane u dijelu I ovog Priloga za određivanje vitamina A i dijelu II ovog Priloga za određivanje vitamina E.

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa vitamina E u hrani za životinje i predsmještama vrši se prema sljedećoj metodi. Sadržaj vitamina E izražava se u mg DL- α -tokoferol acetata na kg. Količina od 1 mg DL- α -tokoferol acetata odgovara količini od 0,91 mg DL- α -tokoferola (vitamina E).

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

2. Princip

Uzorak se hidrolizuje rastvorom etanol kalijum hidroksida, a vitamin E se ekstrahuje petrol etrom. Rastvor se ukloni uparavanjem, a ostatak rastvori u metanolu i prema potrebi razblaži do tražene koncentracije. Sadržaj vitamina E određuje se reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (RP-HPLC) i UV ili fluorescentnim detektorom.

3. Reagensi

- 3.1. Etanol, $\sigma=96\%$.
- 3.2. Petrol etar, tačka ključanja 40–60°C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Rastvor kalijum hidroksida, $c=50$ g/100 ml.
- 3.5. Rastvor natrijum askorbata, $c=10$ g/100 ml.
- 3.6. Natrijum sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x=7-9$).
- 3.6.1. Rastvor natrijum sulfida, $c=0,5$ mol/l u glicerolu, $\beta=120$ g/l (za $x=9$)
- 3.7. Rastvor fenolfaleina, $c=2$ g/100 ml u etanolu (tačka 3.1.).
- 3.8. Mobilna faza za HPLC: smjesa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v+v). Tačan odnos se određuje u skladu sa osobinama korišćene kolone.
- 3.9. Azot, bez kiseonika.
- 3.10. DL- α -tokoferol acetat, posebne čistoće, sertifikovane aktivnosti.
- 3.10.1. Osnovni rastvor DL- α -tokoferol acetata: izmjeri se 100 mg DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u etanolu (tačka 3.1.) i dopuni istim rastvorom do oznake. 1 ml ovog rastvora sadrži 1 mg DL- α -tokoferol acetata.
- 3.10.2. DL- α -tokoferol, posebne čistoće, sertifikovane aktivnosti.
- 3.10.3. Osnovni rastvor DL- α -tokoferola: izmjeri se 100 mg DL- α -tokoferola (tačka 3.10.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u etanolu (tačka 3.1.) i dopuni istim rastvorom do oznake. 1 ml tog rastvora sadrži 1 mg DL- α -tokoferola.
- 3.10.4. 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT).

3. Oprema

- 3.1. Rotacioni vakuum uparivač.
- 3.2. Laboratorijsko posude od tamnog stakla.
- 3.2.1. Baloni sa ravnim dnom ili konusne tikvice, zapremine 500 ml, sa vratom od brušenog stakla.
- 3.2.2. Izmjerne tikvice sa brušenim čepovima, sa uskim vratom, zapremine 10 ml, 25 ml, 100 ml i 500 ml.
- 3.2.3. Lijeveći za odvajanje, konusni, zapremine 1000 ml, sa brušenim čepovima.
- 3.2.4. Kruškaste tikvice, zapremine 250 ml, sa brušenim čepovima.
- 3.3. Alilnh-ov kondenzator, dužine 300 mm sa krajem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev gasa.
- 3.4. Nabrani filter papir za odvajanje faza, prečnika 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 3.5. Oprema za HPLC sa sistemom za injektiranje.
- 3.5.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 250 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , veličina čestica punjenja 5 ili 10 μm ili ekvivalentna.
- 3.5.2. UV ili fluorescentni detektor sa mogućnošću promjene talasne dužine.
- 3.6. Spektrofotometar sa kvarcnim kivetama od 10 mm.
- 3.7. Vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom.
- 3.8. Uređaj za ekstrakciju (slika 1.) koji se sastoji od:
 - 3.8.1. Staklenog cilindra zapremine 1 liter sa vratom od brušenog stakla i čepom.
 - 3.8.2. Uložak od brušenog stakla sa bočnom ručicom i prilagodljivom cijevi koja prolazi kroz sredinu. Prilagodljiva cijev ima donji dio u obliku slova U i mlaznicu na suprotnom kraju tako da se gornji sloj tečnosti u cilindru može prenijeti u lijevak za odvajanje.

4. Postupak

Napomena: Vitamin E osjetljiv je na (UV) svjetlost i oksidaciju. Svi postupci se izvode bez svjetla (u laboratorijskom posuđu od tamnog stakla ili u staklenim posudama zaštićenim aluminijumskom folijom) i kiseonika (ispira se azotom). Tokom ekstrakcije vazduh iznad tečnosti zamijeni se azotom (povremenim popuštanjem čepa izbjegava se previsoki pritisak).

4.1. Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine prečnika otvora 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje toplote. Mljevenje se mora izvesti neposredno prije vaganja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina E.

4.2. Saponifikacija

U zavisnosti od sadržaja vitamina E, izmjeri se 2–25 g uzorka sa preciznošću od 0,01 g i prenese u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.). Uz stalno vrtložno miješanje, jedno za drugim se dodaje 130 ml etanola (tačka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (tačka 3.12.), 2 ml rastvora natrijum askorbata (tačka 3.5.) i 2 ml rastvora natrijum sulfida (tačka 3.6.). Na balon se priključi kondenzator (tačka 4.3.) i balon potopi u vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom (tačka 4.7.). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi uz refluks. Kroz kondenzator (tačka 4.3.) se doda 25 ml rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.4.) i ostavi uz refluks sljedećih 25 minuta, uz miješanje pod laganom strujom azota. Zatim se kondenzator ispere sa približno 20 ml vode, a udio balona ohladi na sobnoj temperaturi.

4.3. Ekstrakcija

Rastvor za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odvajanje kapaciteta 1000 ml (tačka 4.2.3.) ili u uređaj za ekstrakciju (tačka 4.8.), tako što se ispere sa ukupno 250 ml vode. Zatim se balon za saponifikaciju ispere sa 25 ml etanola (tačka 3.1.) i 100 ml petrol etra (tačka 3.2.) i isprana tečnost prenese u lijevak za odvajanje ili uređaj za ekstrakciju. odnos vode i etanola u pomiješanim rastvorima mora biti približno 2:1. Snažno se mućka 2 minuta, zatim ostavi stajati 2 minuta.

4.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odvajanje (tačka 4.2.3.)

Kad se slojevi razdvoje, sloj petrol etra se prenese u drugi lijevak za odvajanje (tačka 4.2.3). Ekstrakcija se ponovi dva puta sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.) i dva puta sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.).

Pomiješani ekstrakti u lijevku za odvajanje isperu se dva puta sa 100 ml vode, uz lagano vrtložno miješanje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano mućkanje sa dodatnim porcijama od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju rastvora fenolfaleina (tačka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani ekstrakt se filtrira kroz suvi nabrani filter za odjeljivanje faza (tačka 4.4.) u sud zapremine 500 ml (tačka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za razdvajanje i filter se isperu sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), dopuni se petrol etrom (tačka 3.2.) do oznake i dobro promiješa.

4.3.2. Ekstrakcija uređajem za ekstrakciju (tačka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje, zamijeni se čep staklenog valjka (tačka 4.8.1.) uloškom od brušenog stakla (tačka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi odmah iznad nivoa vezane aparature. Pritiskom koji stvara azot u bočnoj ručici gornji sloj petrol etra se prenese u lijevak za odvajanje kapaciteta 1000 ml (tačka 4.2.3.). U stakleni cilindar se doda 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), začepi i dobro promućka. Pričeka se do razdvajanja slojeva, pa se gornji sloj prenese u lijevak za odvajanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), zatim dva puta sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), a slojevi petrol etra se dodaju u lijevak za odvajanje.

Pomiješani ekstrakti petrol etra se isperu, u skladu sa tačkom 5.3.1., zatim se nastavi u skladu sa upustvima u navedenoj tački.

4.4. Priprema rastvora uzorka za HPLC

Alikvotni dio rastvora petrol etra (iz tačke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu zapremine 250 ml (tačka 4.2.4.). rastvor se upari skoro do suva u rotacionom uparivaču (tačka 4.1.) pri sniženom pritisku i temperaturi kupatila do 40° C. Dovođenjem azota (tačka 3.9.) uspostavi se atmosferski pritisak, a tikvica izvadi iz rotacionog uparivača. Preostali rastvor se ukloni strujom azota (tačka 3.9.), a ostatak odmah rastvori u poznatoj zapmini (10– 100 ml) metanola (tačka 3.3.) (koncentracija DL- α -tokoferola mora biti u području 5 μ /ml do 30 μ /ml).

4.5. Određivanje putem HPLC-a

Vitamin E se razdvaja na koloni C₁₈ sa reverznim fazama (tačka 4.5.1.), a koncentracija izmjeri fluorescentnim detektorom (ekscitacija: 295 nm, emisija: 330 nm) ili UV detektorom (292 nm) (tačka 4.5.2.).

Alikvotni dio (npr. 20 μ l) rastvora metanola dobijen u tački 5.4. se injektira i eluira mobilnom fazom (tačka 3.8.). Izračunava se srednja vrijednost visina (površina) pikova za više injektiranja istog rastvora uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pikova za više injektiranja kalibracionih rastvora (tačka 5.6.2.).

Uslovi za HPLC

Sljedeći uslovi predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati. Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.5.1.):	250 mm $\times$ 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 ili 10 μ m ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.8.):	Smješa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v)
Brzina protoka:	1 – 2 ml/min
Detektor (tačka 4.5.2.):	Fluorescentni detektor (ekscitacija: 295 nm/emisija: 330 nm) ili UV detektor (292 nm)

5.6 Kalibracija (DL- α -tokoferol acetat ili DL- α -tokoferol)

5.6.1 Standardni DL- α -tokoferol acetat

5.6.1.1 Priprema radnog standardnog rastvora

Pipetom se prenese 25 ml osnovnog rastvora DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.1.) u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.) i hidrolizuje, u skladu sa tačkom 5.2. Zatim se ekstrahuje petrol etrom (tačka 3.2.) u skladu sa tačkom 5.3. i petrol etrom dopuni do 500 ml. U rotacionom uparivaču osuši se 25 ml tog ekstrakta gotovo do suva, strujom azota ukloni preostali rastvor (tačka 3.9.), a ostatak se ponovo rastvori u 25,0 ml metanola (tačka 3.3.). Nominalna koncentracija tog rastvora iznosi 45,5 μ g DL- α -tokoferola na ml, što je ekvivalentno 50 μ g DL- α -tokoferol acetata na ml. Radni standardni rastvor treba pripremiti svjež prije upotrebe.

5.6.1.2. Priprema kalibracijskog rastvora i kalibracijske krive

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radnog standardnog rastvora u seriju sudova zapremine 20 ml, metanolom (tačka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 μ g/ml DL- α -tokoferol acetata, tj. 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 μ g/ml DL- α -tokoferola.

Više puta se injektira 20 μ l svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih vrijednosti visine (površina) pikova se pripremi kalibraciona kriva.

5.6.1.3. UV standardizacija osnovnog rastvora DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.1.)

Etanolom se razblaži 5,0 ml osnovnog rastvora DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.1.) na 25,0 ml i snimi UV spektar tog rastvora prema etanolu (tačka 3.1.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 250 i 320 nm.

Maksimalna apsorpcija je na 284 nm:

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

Za to razblaženje mora se dobiti vrijednost ekstinkcije u rasponu od 0,84 do 0,88.

5.6.2. Standard DL- α -tokoferola

5.6.2.1 Priprema radnog standardnog rastvora

Pipetom se prenese 2 ml osnovnog rastvora DL- α -tokoferola (tačka 3.11.1.) u sud zapremine 50 ml, rastvori u metanolu (tačka 3.3.) i dopuni do oznake metanolom. Nominalna koncentracija ovog rastvora iznosi 40 μ g DL- α -tokoferola na ml, što je ekvivalentno 44,0 μ g DL- α -tokoferol acetata na ml. Radni standardni rastvor mora se pripremiti svjež prije upotrebe.

5.6.2.2. Priprema kalibracionog rastvora i kalibracione krive

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radnog standardnog rastvora u seriju sud zapremine 20 ml, metanolom (tačka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 μ g/ml DL- α -tokoferola, tj. 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 μ g/ml DL- α -tokoferol acetata.

Više puta se injektira 20 μ l svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) pikripremi kalibraciona kriva.

5.6.2.3. UV standardizacija osnovnog rastvora DL- α -tokoferola (tačka 3.11.1.)

Etanolom se razblaži 2,0 ml osnovnog rastvora DL- α -tokoferola (tačka 3.11.1.) na 25,0 ml te se snimi UV spektar ovog rastvora prema etanolu (tačka 3.1.) u spektrofotometru (tačka 4.6.) između 250 i 320 nm. Maksimalna apsorpcija je na 292 nm:

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

Za to razblaženje mora se dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,6.

5. Izračunavanje rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova vitamina E iz rastvora uzorka se određuje koncentracija rastvora uzorka u μ g/ml (izračunana kao α -tokoferol acetat) iz kalibracione krive (tačka 5.6.1.2. ili 5.6.2.2.).

Sadržaj vitamina E (w) u mg/kg u uzorku izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

c - koncentracija vitamina E (kao α -tokoferol acetata u rastvoru uzorka (tačka 5.4.) u μ g/ml

V_1 - zapremina rastvora uzorka (tačka 5.4.) u ml;

V_2 - zapremina alikvota korištenog u tački 5.4., u ml;

m - masa uzorka u gramima.

6. Napomene

6.1. Kod uzoraka sa niskom koncentracijom vitamina E može biti korisno pomiješati ekstrakte petroletra iz dvije zavisna posupka saponifikacije (izmjerena količina: 25 g) u jedan rastvor uzorka za određivanje HPLC-om.

6.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

6.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (tačka 3.1.) za razbijanje emulzije.

6.4. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja rastvora DL- α -tokoferol acetata ili rastvora DL- α -tokoferola u skladu sa tačkom 5.6.1.3. ili 5.6.2.3., doda se približno 10 mg BHT-a (tačka 3.12.) u rastvor (tačka 3.10.1. ili 3.10.2.), a rastvor čuva u frižideru (može se držati najduže 4 nedjelje).

6.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrohinon.

6.6. Običnom faznom kolonom može se razdvojiti α -, β -, γ - i δ -tokoferol.

6.7. Umjesto rastvora natrijum askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

6.8. Umjesto rastvora natrijum sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

6.9. Acetat vitamina E se u baznim uslovima vrlo brzo hidrolizuje, zato je vrlo osjetljiv na oksidaciju, posebno u prisustvu elemenata u tragovima, poput gvožđa i bakra. Postupak određivanja vitamina E u premiksima sa nivoima višim od 5 000 mg/kg može dovesti do razgradnje vitamina E. Zbog toga se za potvrdu preporučuje metoda HPLC sa enzimskom razgradnjom struktura vitamina E bez alkalne saponifikacije.

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 15% najvišeg rezultata.

8. Rezultati međulaboratorijske studije¹

	Predsmješa	Gotove predsmješe za ishranu životinja	Mineralni koncentrat	Proteinska hrana za životinje	Hrana za prasiće
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
srednja vrijednost [IU/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [IU/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [IU/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV, [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [IU/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [IU/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L - broj laboratorija

n - broj pojedinačnih vrijednosti

s_r - standardna devijacija ponovljivosti

s_R - standardna devijacija obnovljivosti

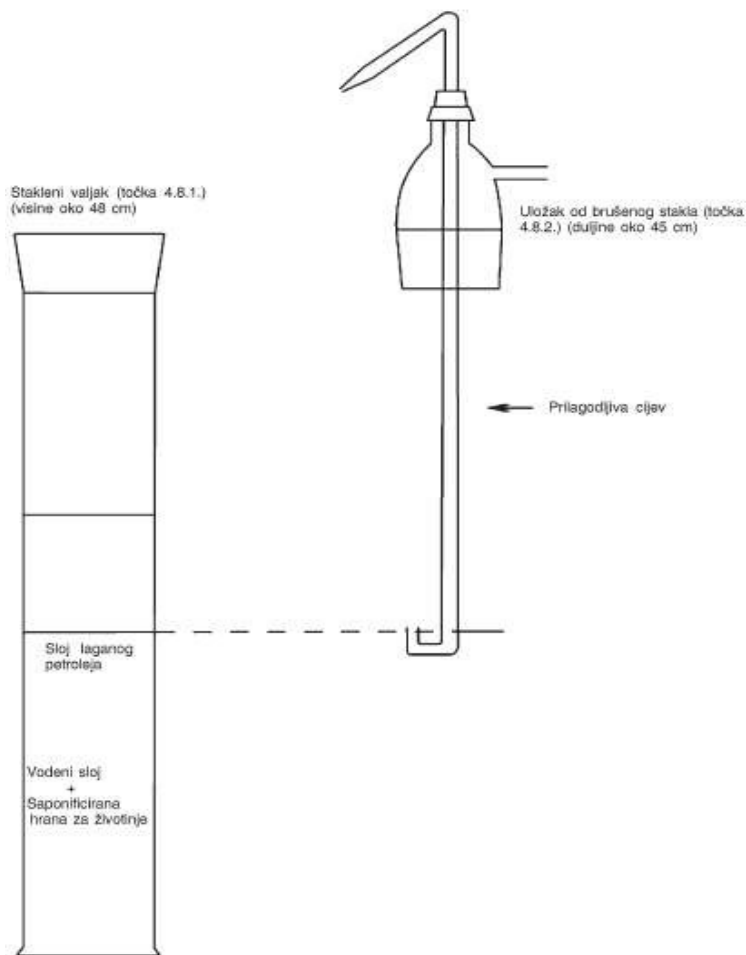
r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



¹ - Studija za stočnu hranu pri Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Dio III

ODREĐIVANJE GVOŽĐA, BAKRA, MANGANA I CINKA U TRAGOVIMA

Sadržaj gvožđa, bakra, mangana i cinka određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, gvožđa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, sumpora, gvožđa, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod pritiskom, ili
- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17053 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje elemenata u tragovima, teških metala i ostalih elemenata u hrani metodom ICP-MS (multimetoda), ili
- analitičkom metodom utvrđenom u normi EN ISO 6869 Hrana za životinje: Određivanje udjela kalcija, bakra, željeza, magnezijuma, mangana, kalijuma, natrijuma i cinka – Metoda u kojoj se upotrebljava atomska apsorpcijska spektrometrija, ili metodom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije (FAAS), kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku

1. Predmet i područje primjene

Određivanje gvožđa, bakra, mangana i cinka u tragovima u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granice za kvantifikaciju su:

- gvožđe (Fe): 20 mg/kg
- bakar (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- cink (Zn): 20 mg/kg.

2. Princip

Nakon razgradnje eventualno prisutnih organskih materija uzorak se rastvori u hlorovodoničnoj kiselini. Nakon pogodnog razblaženja, atomskom apsorpcijskom spektrometrijom određuju se elementi gvožđe, bakar, mangan i cink.

3. Reagensi

Uvodne napomene

Za pripremanje reagenasa i rastvora za analizu koristi se voda bez katjona koje treba odrediti, dobijena dvostrukom destilacijom vode u destilatoru od borosilikatnog ili kvarcnog stakla ili dvostrukom obradom jonsko-izmjenjivačkom smolom.

Reagensi moraju biti najmanje analitičke čistoće. Odsutnost elementa koji se određuje provjerava se sljepom probom. Prema potrebi se reagensi moraju dodatno prečistiti.

Umjesto dolje navedenih standardnih rastvora mogu se koristiti komercijalni standardni rastvori pod uslovom da imaju garanciju i da se prije upotrebe provjere.

3.1. Hlorovodonična kiselina (d: 1,19 g/ml).

3.2. Hlorovodonična kiselina (6 mol/l).

3.3. Hlorovodonična kiselina (0,5 mol/l).

3.4. Fluorovodonična kiselina 38–40% (v/v) sa sadržajem gvožđa (Fe) manjim od 1 mg/l i ostatkom nakon iparavanja manjim od 10 mg/l (u obliku sulfata).

3.5. Sumporna kiselina (g: 1,84 g/ml).

3.6. Vodonič peroksid (približno 100 zapreminskih dijelova kiseonika (30% po masi)).

3.7. Standardni rastvor gvožđa (1000 µg Fe/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor: rastvori se 1 g gvožđe žice u 200 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.), doda 16 ml vodonič peroksida (tačka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.7.1. Radni standardni rastvor gvožđa (100 µg Fe/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.7.) sa 9 dijelova vode.

3.8. Standardni rastvor bakra (1 000 µg Cu/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:

- rastvori se 1 g bakra u prahu u 25 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.), doda 5 ml vodonič peroksida (tačka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.8.1. Radni standardni rastvor bakra (10 µg Cu/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.8.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.

3.9. Standardni rastvor mangana (1 000 µg Mn/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:

- rastvori se 1 g mangana u prahu u 25 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.9.1. Radni standardni rastvor mangana (10 µg Mn/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.9.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.

3.10. Standardni rastvor cinka (1 000 µg Zn/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:

- rastvori se 1 g cinka u obliku folije ili listića u 25 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.10.1. Radni standardni rastvor cinka (10 µg Zn/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.10.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.

3.11. Rastvor lantan hlorida: rastvori se 12 g lantan oksida u 150 ml vode, doda se 100 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.

4. Oprema

4.1. Mufolna peč sa regulacijom temperature i po mogućnosti pisačem.

4.2. Stakleni dijelovi moraju biti od otpornog borsilikata, a preporučuje se upotreba opreme koja je namijenjena isključivo određivanju elemenata u tragovima.

4.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar spunjava zahtjeve metode s obzirom na osjetljivost i tačnosti u potrebnom području.

5. Postupak²

5.1. Uzorci koji sadrže organske materije

5.1.1. Spaljivanje i priprema rastvora za analizu³

5.1.1.1. Izmjeri se 5–10 g uzorka sa preciznošću od 0,2 mg i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine, osuši u sušnici na 105° C i postavi u hladnu mufolnu peč (tačka 4.1.). Peč se zatvori, a temperatura se tokom 90 minuta postupno podiže na 450–475° C. Ta temperatura se zadrži 4–16 sati (npr. tokom noći) kako bi se uklonile ugljenikove materije, a zatim se peč otvori i ohladi.

Pepeo se navlaži vodom i prenese u čašu zapremine 250 ml. Lončić se ispere sa ukupno približno 5 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.), a sadržaj se polako i oprezno prenese u čašu (može doći do burne reakcije zbog stvaranja CO₂). U kapljicama se dodaje hlorovodonična kiselina (tačka 3.1.), uz stalno miješanje dok ne prestane pjenušanje. Upari se do suva, uz povremeno miješanje staklenim štapićem.

Zatim se u ostatak doda 15 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i približno 120 ml vode. Promiješa se staklenim štapićem, koji se ostavi u čaši, a čaša se pokrije sahatnim staklom. Polako se zagrijava do ključanja i ostavi ključati do potpunog rastvaranja pepela. Filtrira se kroz filter koji ne sadrži pepeo i prikupi u sud zapremine 250 ml. Čaša i filter se isperu sa 5 ml vruće hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dva puta vrelom vodom. Sud se napuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Ako ostatak na filtru izgleda crn (ugljenik), ponovo se stavi u peč i spali na 450–475° C. To je spaljivanje, za koje treba samo nekoliko sati (približno 3–5 sati), gotovo kada pepeo postane bijel ili gotovo bijel. Ostatak se rastvori sa približno 2 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.), upari se do suva i doda 5 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.). Zagrije se, rastvor se filtrira u sud i dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

Napomene:

(a) Pri određivanju elemenata u tragovima važno je biti na oprezu zbog opasnosti od kontaminacije, posebno cinkom, bakrom i gvožđem. Zbog toga oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ne smije sadržavati navedene metale.

Kako bi se smanjio opšti rizik od zagađenja treba raditi u atmosferi bez prašine sa potpuno čistom opremom i dobro opranim staklenim posuđem. Određivanje cinka posebno je osjetljivo na više vrsta kontaminacije, npr. staklenim posuđem, reagensima, prašinom itd.

(b) Masa uzorka koji se spaljuje izračunava se iz približnog sadržaja elementa u tragovima u hrani za životinje s obzirom na osjetljivost korišćenog spektrofotometra. Kod nekih vrsta hrane za životinje sa niskim sadržajem elemenata u tragovima trebaće možda započeti sa 10–20 g uzorka i konačni rastvor dopuniti do samo 100 ml.

(c) Spaljivanje se mora izvesti u zatvorenoj peći bez uduvavanja vazduha ili kiseonika.

(d) Temperatura na pirometru ne smije prijeći 475 °C.

5.1.2. Određivanje spektrofotometrijom

5.1.2.1. Priprema kalibracionog rastvora

Za svaki element koji se određuje pripremi se serija kalibracionih rastvora od standardnih radnih rastvora iz tač. 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. i 3.10.1. ovog dijela, pri čemu koncentracija HCl u svakom iznosi približno 0,5 mol/l i (u slučaju gvožđa, mangana i cinka) koncentraciju lantan hlorida koja odgovara 0,1% La (m/v)).

Odabrane koncentracije elemenata u tragovima moraju biti unutar područja osjetljivosti korišćenog spektrofotometra.

Sastavi tipičnih područja kalibracionih rastvora, zavisno od vrste i osjetljivosti korišćenog spektrofotometra dati su sljedećim tabelama.

Gvožđe							
µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.7.1.) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							
Bakar							
µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.8.1.) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (tačka 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 radnog standardnog rastvora (tačka 3.9.1.) (1 ml = 100 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							
Cink							
µg Zn/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.10.1.) (1 ml = 100 µg Zn)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							

5.1.2.2. Priprema rastvora za analizu

Za određivanje bakra, rastvor pripremljen u skladu sa tačkom 5.1.1. obično se može koristiti direktno. Ako je koncentraciju potrebno prilagoditi tako da bude u području kalibracionih rastvora, pipetom se prenese alikvotni dio u građuisanu tikvicu zapremine 100 ml i dopuni do oznake hlorovodoničnom kiselinom 0,5 mol/l (tačka 3.3.).

Za određivanje gvožđa, mangana i cinka, pipetom se u sud zapremine 100 ml prenese alikvotni dio rastvora pripremljenog u skladu sa tačkom 5.1.1., doda 10 ml rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) i dopuni do oznake hlorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (tačka 3.3.).

5.1.2.3. Slijepa proba

Slijepa proba mora obuhvatati sve propisane korake postupka, osim što se izostavlja uzorak. Kao rastvor za slijepu probu ne smije se koristiti kalibraconi rastvor „0l“.

5.1.2.4. Mjerenje atomske apsorpcije

Oksidacijskim plamenom vazduh-acetilen, izmjeri se atomska apsorpcija kalibracijskih rastvora i rastvora koju treba analizirati, na sljedećim talasnim dužinama:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Svako se mjerenje izvodi četiri puta.

5.2. Mineralna mješavina

Ako uzorak ne sadrži organske materije, nije potrebno prethodno spaljivanje. Nastavlja se kako je opisano u tački 5.1.1.1. počevši od drugog stava. Može se izostaviti isparavanje u prisutnosti fluorovodonične kiseline.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija elementa u tragovima u rastvoru koja se analizira izračunava se iz kalibracione krive, a rezultat se iskazuje u miligramima elementa u tragovima na kilogram uzorka (ppm).

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupka određivanja koja na istom uzorku izvodi isti analitičar ne smije preći:

- 5 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima do 50 mg/kg,
- 10% višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima od 50–100 mg/kg,
- 10 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima od 100–200 mg/kg,
- 5 % višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima iznad 200 mg/kg.

8. Napomena

Prisutnost velike količine fosfata može ometati postupak određivanja gvožđa, mangana i cinka. Takve se smetnje moraju korigirati dodavanjem rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.). Ako je, međutim, maseni odnos u uzorku (Ca + Mg/P) > 2, može se izostaviti dodavanje rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) u rastvoru za analizu i u kalibracijskom rastvoru.

²- Mogu se koristiti i druge metode za mineralizaciju ako dokazano garantuju uporedive rezultate (poput, mikrotalasne mineralizacije pod pritiskom).

³ - U zelenim hranivima (svježim ili osušenim) mogu se naći velike količine kvarca biljnog porijekla koji može sadržati elemente u tragovima koje treba ukloniti. Kod uzoraka takve hrane za životinje treba sprovesti sljedeći izmijenjeni postupak. Sprovodu se postupci iz tačke 5.1.1.1. sve do filtracije. Filter papir koji sadrži nerastvorljiv ostatak se dva puta ispere vrelom vodom i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine. Spali se u mufolnoj peći (tačka 4.1.) na temperaturi nižoj od 550° C do potpunog nestanka svih ugljenih materija. Ostavi se da se ohladi, doda se nekoliko kapi vode i 10–15 ml fluoridne kiseline (tačka 3.4.), zatim se upari do suva na otprilike 150° C. Ako se u ostatku i dalje nalazi kvarcni pijesak, ponovo se rastvori u nekoliko mililitara fluoridne kiseline (tačka 3.4.) i upari do suva. Doda se pet kapi sumporne kiseline (tačka 3.5.) i zagrijava dok ne prestane izlaziti bijeli dim. Nakon dodavanja 5 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i oko 30 ml vode, zagrije se i rastvor filtrira u sud zapremine 250 ml te dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl oko 0,5 mol/l). Nastavi se sa utvrđivanjem u skladu s tačkom 5.1.2.

Dio IV ODREĐIVANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa halofuginona u hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećom metodom. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. Princip

Nakon obrade vrućom vodom halofuginon se ekstrahuje u obliku slobodne baze u etil acetatu, zatim razdvoji kao hidroklorid u vodenom rastvoru kiseline. Ekstrakt se prečišćava jonsko-izmjenjivačkom hromatografijom. Udio halofuginona određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) reverznih faza uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Acetonitril, za HPLC.

3.2. Smola Amberlite XAD-2.

3.3. Amonijum acetat.

3.4. Etil acetat.

3.5. Sirćetna kiselina, glacialna

3.6. Standardna supstanca halofuginona (DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-hidroksi-2-piperidil] acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid, E 764).

3.6.1. Osnovni rastvor standarda halofuginona, 100 µg/ml

Izmjeri se 50 mg halofuginona (tačka 3.6.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 500 ml, rastvori u puferском rastvoru amonijum acetata (tačka 3.18.), dopuni puferским rastvorom do oznake i promiješa. Taj je rastvor stabilan tri nedjelje na temperaturi od 5 °C ako se čuva na tamnom mjestu.

3.6.2. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 100 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.6.1.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (tačka 3.21.) i promiješa. U tim rastvorima koncentracija halofuginona iznosi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml. Ovi se rastvori moraju pripremati svježi prije upotrebe.

3.7. Hlorovodična kiselina (p_{20} približno 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Srebro nitrat.

3.10. Natrijum askorbat.

3.11. Natrijum karbonat.

3.12. Natrijum hlorid.

3.13. EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina, dinatrijuma so).

3.14. Voda, za HPLC.

3.15. Rastvor natrijum karbonata, $c = 10$ g/100 ml.

3.16. Rastvor natrijum karbonata zasićen natrijum hloridom, $c = 5$ g/100 ml.

U vodi se rastvori 50 g natrijum karbonata (tačka 3.11.), razblaži do 1 litra, zatim se dodaje natrijum hlorid (tačka 3.12.) do zasićenja rastvora.

3.17. Hlorovodična kiselina, približno 0,1 mol/l.

Vodom se razblaži 10 ml HCl (tačka 3.7.) do 1 litra.

3.18. Puferский rastvor amonijum acetata, približno 0,25 mol/l.

U vodi (tačka 3.14) se rastvori 19,3 g amonijum acetata (tačka 3.3.) i 30 ml sirćetne kiseline (tačka 3.5.) i razblaže do 1 litra.

3.19. Priprema smole Amberlite XAD-2.

Vodom se ispere odgovarajuća količina Amberlita (tačka 3.2.) dok se ne uklone svi hloridni joni, što se pokazuje ogledom sa srebrom nitratom (tačka 3.20.) u odbačenoj vodenoj fazi. Zatim se smola ispere s 50 ml metanola (tačka 3.8.), metanol se odbaci, a smola čuva u svježem metanolu.

3.20. Rastvor srebro nitrata, približno 0,1 mol/l.

Rastvori se 0,17 g srebro nitrata (tačka 3.9.) u 10 ml vode.

3.21. Mobilna faza HPLC-a.

Pomiješa se 500 ml acetonitrila (tačka 3.1.) s 300 ml puferского rastvora amonijum acetata (tačka 3.18.) i 1 200 ml vode (tačka 3.14.). Sirćetnom kiselinom (tačka 3.5.) se vrijednost pH podesi na 4,3. Filtrira se kroz filter 0,22 µm (tačka 4.8.), i rastvor se degasifikuje (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu). Taj je rastvor stabilan mjesec dana ako se drži u zatvorenoj posudi u tamnom prostoru.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučno kupatilo

4.2. Rotacioni vakuum uparivač

4.3. Centrifuga

4.4. HPLC s ultraljubičastim detektorom (UV) s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektorom s nizom dioda (DAD).

4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 300 mm × 4 mm, C_{18} , veličina čestica punjenja 10 µm iliekvivalentna kolona

4.5. Staklena kolona (300 mm × 10 mm) s filtrom od sinterovanog stakla i slavinom

4.6. Filteri od staklenih vlakana, prečnika 150 mm

4.7. Membranski filteri, 0,45 µm

4.8. Membranski filteri, 0,22 µm

5. Postupak

Napomena: Halofuginon kao slobodna baza je nestabilan u alkalnim i etil-acetatnim rastvorima. Ne smije se ostaviti u etil acetatu duže od 30 minuta.

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nijesu prisutni niti halofuginon niti interferentne materije.

5.1.2. Test iskorišćenja (recovery) izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina halofuginona slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 3 mg/kg u 10 g slijepe probe hrane za životinje doda se 300 µl osnovnog rastvora standarda (tačka 3.6.1.), promiješa i pričekava 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (tačka 5.2.).

Napomena: Za sprovođenje ove metode, slijepe proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost halofuginona.

5.2. Ekstrakcija

Izmjere se 10 g pripremljenog uzorka s preciznošću od 0,1 g i prenese u epruvetu za centrifugiranje zapremine 200 ml, doda se 0,5 g natrijum askorbata (tačka 3.10.), 0,5 g EDTA (tačka 3.13.) i 20 ml vode i promiješa. Epruveta se 5 minuta drži u vodenom kupatilu (80 °C). Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi doda se 20 ml rastvora natrijum karbonata (tačka 3.15.) i promiješa. Odmah se doda 100 ml etilacetata (tačka 3.4.) i 15 sekundi snažno protrese rukom. Zatim se epruveta 3 minuta drži u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) i otpusti slavinom. Centrifugira se 2 minuta, te se faza etilacetata dekantuje kroz filter od staklenih vlakana (tačka 4.6.) u lijevak za razdvajanje od 500 ml. Ponovi se ekstrakcija uzorka s dodatnih 100 ml etilacetata. Pomiješani ekstrakti se isperu 1 minut sa 50 ml rastvora natrijum karbonata zasićenim natrijum hloridom (tačka 3.16.), a vođeni se sloj odbaci.

Organski sloj se ekstrahuje 1 minut sa 50 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.17.). Donji kiseliniski sloj se prenese u lijevak za razdvajanje od 250 ml. Organski sloj se ponovo ekstrahuje 1,5 minut s dodatnih 50 ml hlorovodične kiseline i pomiješa s prvim ekstraktom. Pomiješani kiseliniski ekstrakti se približno 10 sekundi ispiraju protresivanjem s 10 ml etilacetata (tačka 3.4.).

Vodeni sloj se kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml, a organska faza se odbaci. Iz kiselog rastvora se u rotacionom uparivaču (tačka 4.2.) ispari sav preostali etilacetat. Temperatura vodenog kupatila ne smije preći 40 °C. Pod vakuumom na približno 25 milibara, odstrani se sav preostali etilacetat u 5 minuta na 38 °C.

5.3. Prečišćavanje ekstrakta

5.3.1. Priprema kolone s Amberlitom

Pripremi se kolona XAD-2 za svaki ekstrakt uzorka. Metanolom (tačka 3.8.) se prenese 10 g pripremljenog Amberlita (tačka 3.19.) u staklenu kolonu (tačka 4.5.). Na vrh punjenja smole postavi se tampon od staklene vune. Metanol se ispusti iz kolone, a smola ispere sa 100 ml vode tako da se dotok vode zaustavi kada tečnost dostigne vrh smole. Prije upotrebe kolona se ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežila. Kolona se nikad ne smije isušiti.

5.3.2. Prečišćavanje uzorka

Ekstrakt (tačka 5.2.) se kvantitativno prenese na vrh pripremljene kolone sa Amberlitom (tačka 5.3.1.) i eluira, a eluat se odbaci. Brzina eluiranja ne smije biti veća od 20 ml/min. Tikvica s okruglim dnom se ispere s 20 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.17.), a zatim se ista iskoristi za ispiranje kolone sa smolom.

Kisjelina koja zaostane na koloni ukloni se produvavanjem vazduhom. Odbaci se tečnost od ispiranja. U kolonu se doda 100 ml metanola (tačka 3.8.), i 5 – 10 ml se eluira, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml. Preostali se metanol ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežio sa smolom te se nastavi eluiranje brzinom koja ne prelazi 20 ml/min, a eluat se prikuplja u istoj tikvici s okruglim dnom. Metanol se uspari na rotacijskom uparivaču (tačka 4.2.), pri čemu temperatura vodenog kupatila ne smije preći 40 °C. Ostatak se upotrebom mobilne faze (tačka 3.21.) kvantitativno prenese u graduisanu tikvicu zapremine 10 ml. Dopuni se mobilnom fazom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (tačka 4.7.). Taj se rastvor čuva za određivanje HPLC-om (tačka 5.4.).

5.4. HPLC određivanje

5.4.1. Parametri

Sljedeći se uslovi predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.4.1.)

Mobilna faza HPLC-a (tačka 3.21.)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Talasna dužina detekcije: 243 nm

Zapremina za ubrizgavanje: 40 do 100 µl

Provjeri se stabilnost hromatografskog sistema injektiranjem kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2) koncentracije 3,0 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna retencionna vremena.

5.4.2. Kalibraciona kriva

Svaki se kalibracioni rastvor (tačka 3.6.2.) injektira više puta i za svaku se koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednake zapremine kao za kalibracioni rastvor, a zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova halofuginona.

6. Preračun rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika halofuginona u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.4.2.).

Sadržaj halofuginona (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

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

pri čemu je:

c= koncentracija halofuginona u rastvoru uzorka u µg/ml,

m=količina ispitivanog uzorka u gramima

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili upotrebom detektora s nizom dioda (DAD) kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2.) koncentracije 6,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka doda se određena količina kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2.). Količina dodanog halofuginona mora biti slična procijenjenoj količini halofuginona u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika halofuginona uzimajući u obzir dodatke količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini maksimalne visine mora biti unutar ±10% početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora sa nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;

(b) između 225 i 300 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita;

(c) između 225 i 300 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha pika i krive pada pika dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne treba da se međusobno razlikuju za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije preći 0,5 mg/kg za udio halofuginona do 3 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje⁴ u kojem je osam laboratorija analiziralo tri uzorka:

Rezultati					
	Uzorak A (slijepi) kod prijema	Uzorak B (brašno)		Uzorak C (pelete)	
		Kod prijema	Nakon 2 mjeseca	Kod prijema	Nakon 2 mjeseca
Srednja vrijednost [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
SR[mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND= nije detektovano

SR=standardna devijacija obnovljivosti

CV_R=koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Rec=iskorišćenje3

Dio V

ODREĐIVANJE ROBENIDINA

1,3-bis [(4-hlorbenziliden)amino]gvanidin – hidrohlorid

Sadržaj robenidina određuje se

— analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % I neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili

— tečnom hromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (HPLC) uz upotrebu UV detektora, kako je opisano u točkama od 1. do 8. u nastavku.

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa robenidina u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje zakiseljenim metanolom. Ekstrakt se osuši i alikvotni dio prečisti na koloni aluminijum oksida. Robenidin se eluira metanolom iz kolone, koncentruje i dopuni mobilnom fazom do odgovarajuće zapremine. Udio robenidina se određuje tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznim fazama uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol.

3.2. Zakiseljeni metanol.

U sud zapremine 500 ml prenese se 4,0 ml hlorovodične kiseline ($p_{20} = 1,18$ g/ml), dopuni metanolom (tačka 3.1.) do oznake i promiješa. Taj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.3. Acetonitril, za HPLC.

3.4. Molekulska sito.

Tip 3A, otvori mreže od 8 do 12 (otvori promjera 1,6 – 2,5 mm, kristalni aluminijum silikat, promjer pora 0,3 mm).

3.5. Aluminijum oksid kiseline aktivnosti I. stepena, za kolonsku hromatografiju.

U odgovarajuću posudu prenese 100 g aluminijum oksida i doda 2,0 ml vode. Začepi se i promućka približno 20 minuta. Drži se u čvrsto zatvorenoj posudi.

3.6. Rastvor kalijum dihidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.

U vodi se rastvori 3,40 g kalijum dihidrogenfosfata (za HPLC) u sudu zapremine 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.7. Rastvor dinatrijum hidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.

U vodi se rastvori 3,55 g bezvodnog dinatrijum hidrogenfosfata (ili 4,45 g dihidrata ili 8,95 g dodekahidrata) (za HPLC) u sudu zapremine 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.8. Mobilna faza HPLC-a.

Pomiješaju se sljedeći reagensi:

650 ml acetonitrila (tačka 3.3.),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml rastvora kalijum dihidrogenfosfata (tačka 3.6.),

50 ml rastvora dinatrijum hidrogenfosfata (tačka 3.7.).

Filtrira se kroz filter 0,22 μ m (tačka 4.6.), rastvor se zatim degasifikuje (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu).

3.9. Standardna supstanca.

Čisti robenidin: 1,3-bis[4-hlorbenziliden]amino]gvanidin – hidrohlorid.

3.9.1. Osnovni rastvor standarda robenidina: 300 μ g/ml.

Izmjeri se 30 mg standarda robenidina (tačka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg. Rastvori se u zakiseljenom metanolu (tačka 3.2.) u sudu zapremine 100 ml, dopuni istim rastvorom do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijumskom folijom i čuva na tamnom mjestu.

3.9.2. Intermedijarni rastvor standarda robenidina: 12 μ g/ml

U sudu zapremine 250 ml prenese se 10,0 ml osnovnog rastvora standarda robenidina (tačka 3.9.1.), dopuni mobilnom fazom (tačka 3.8.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijumskom folijom i čuva na tamnom mjestu.

3.9.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.9.2.). Dopuni se mobilnom fazom (tačka 3.8.) do oznake i promiješa. Ti rastvori odgovaraju koncentracijama robenidina od 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 i 6,0 μ g/ml. Ti se rastvori moraju pripremiti svježi prije upotrebe.

3.10. Voda za HPLC.

4. Oprema

4.1. Staklena kolona.

Od tamnog stakla, s slavinom i rezervoarom zapremine približno 150 ml, unutašnjeg prečnika 10 – 15 mm, dužine 250 mm

4.2. Mehanički šejker ili magnetna mješalica.

4.3. Rotacioni vakuum uparivač.

4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom (UV) s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektorom s nizom dioda (DAD) s radnim područjem od 250 – 400 nm.

4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju: 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , s veličinom čestica punjenja 10 μ m ili ekvivalentna.

4.5. Filter papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentni).

4.6. Membranski filteri, 0,22 μ m.

4.7. Membranski filteri, 0,45 μ m.

5. Postupak

Napomena: Robenidin je osjetljiv na svjetlo. U svim se postupcima mora koristiti posude od tamnog stakla.

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan niti robenidin niti interferentne materije.

Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje (tačka 5.1.1.) kojoj se doda količina robenidina slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 60 mg/kg prenese se 3,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.9.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml. Rastvor se upari u struji azota do približno 0,5 ml. Doda se 15 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa, ostavi 10 minuta i nastavi s ekstrakcijom (tačka 5.2.).

Napomena: Pri sprovođenju ove metode slijepe proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost robenidina.

5.2. Ekstrakcija

Izmjeri se približno 15 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 250 ml, doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.2.), začepi i mućka jedan sat na šejkeru (tačka 4.2.). Rastvor se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (tačka 4.5.) u konusnu tikvicu zapremine 150 ml. Doda se 7,5 g molekulskog sita (tačka 3.4.), začepi i mućka pet minuta. Odmah se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana. Ovaj se rastvor čuva za fazu prečišćavanja (tačka 5.3.).

5.3. Prečišćavanje

5.3.1. Priprema kolone s aluminijum oksidom

U donji dio staklene kolone (tačka 4.1.) postavi se mali čep od staklene vune i nabije staklenim štapićem. Izmjeri se 11,0 g pripremljenog aluminijum oksida (tačka 3.5.) i prenese u kolonu. Pri tom treba paziti da izloženost vazduhu tokom navedenog postupka bude što je moguće manja. Laganim udarcima po donjem dijelu napunjene kolone istaloži se aluminijum oksid.

5.3.2. Prečišćavanje uzorka

U kolonu se pipetom prenese 5,0 ml ekstrakta uzorka pripremljenog u (tačka 5.2.). Vrh pipete se nasloni na zid kolone, zatim se pusti da aluminijum oksid apsorbuje rastvor. Robenidin se eluira iz kolone sa 100 ml metanola (tačka 3.1.) uz brzinu protoka od 2 – 3 ml/min, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml. Rastvor metanola se upari u rotacionom uparivaču (tačka 4.3.) do suva pri sniženom pritisku, na 40 °C. Ostatak se ponovo rastvori u 3 – 4 ml mobilne faze (tačka 3.8.) i prenese u sud zapremine 10 ml. Tikvica se nekoliko puta ispere s 1 – 2 ml mobilne faze, a isprana tečnost prenese u

sud. Dopuni se istim rastvorom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.7.). Ovaj se rastvor čuva za određivanje na HPLC-u (tačka 5.4.).

5.5. HPLC određivanje

5.4.1 Parametri

Sledeći uslovi se predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati:

kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.4.1.),

Mobilna faza HPLC (tačka 3.8.),

brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min,

talasna dužina detekcije: 317 nm,

injektovana zapremina: 20 – 50 µl.

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektovanjem kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.) koncentracije 3,6 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retencionna vremena

5.4.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.9.3.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednake zapremine kao za kalibracione rastvore, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova robenidina.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visina (površina) pikova robenidina u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.4.2.).

Sadržaj robenidina (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$W = \frac{c \times 200}{m}$$

pri čemu je:

c= koncentracija robenidina u rastvoru uzorka u µg/ml,

m= masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.) koncentracije 6 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.). Količina dodatog robenidina mora biti slična procijenjenoj količini robenidina u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika robenidina uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini maksimalne visine mora biti unutar približno 10 % početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda (DAD)

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar približno 2 nm;

(b) između 250 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100% relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15% apsorpcije standardnog analita;

(c) između 250 i 400 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15% apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije preći 10 % vrijednosti višeg rezultata za udio robenidina viši od 15 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje treba da iznosi najmanje 85 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijska ispitivanja u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za živinu i kuniće u obliku brašna i peleta, a svaki se uzorak analizirao dvaput i rezultati analize dati su u sljedećoj tabeli:n

	Hrana za živinu		Hrana za kuniće	
	Brašno	Pelet	Brašno	Pelet
Srednja vrijednost [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
S _r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV _r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S _R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Iskorišćenje [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r=standardna devijacija ponovljivosti

CV_r=koeficijent varijacije ponovljivosti (%)

S_R=standardna devijacija obnovljivosti

CV_R=koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Dio VI

ODREĐIVANJE DIKLAZURILA

(+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitril

Sadržaj diklazurila određuje se:

— analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
— tečnom hromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom i ternarnim gradijentom (HPLC) uz upotrebu UV detektora, kako je opisano u tačkama od

1. do 9. u nastavku.

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa diklazurila u hrani za životinje i premiksima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije iznosi 0,1 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,5 mg/kg.

2. Princip

Nakon dodavanja internog standarda, uzorak se ekstrahuje zakisjelijem metanolom. Kod hrane za životinje alikvot ekstrakta se prečišćava na koloni sa SPE C₁₈ punjenjem. Diklazuril se eluira sa sa kolone smješom zakisjelijem metanolom i vode. Nakon uparavanja, ostatak se rastvori u smješi DMF/voda. Kod premiksa, ekstrakt se upari, a ostatak rastvori u smjesi DMF/voda. Udio diklazurila određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom i ternarnim gradijentom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Voda, za HPLC.

3.2. Amonijum acetat.

3.3. Tetrabutilamonijum hidrogen sulfat (TBHS).

3.4. Acetonitril, za HPLC.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. N,N-dimetilformamid (DMF).

3.7. Hlorovodična kiselina, $p_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8. Standardna supstanca: Diklazuril II-24: (+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetanitril, garantovane čistoće, E771.

3.8.1. Osnovni rastvor standarda diklazurila, 500 µg/ml.

Izmjeri se 25 mg standardne materije diklazurila (tačka 3.8.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 50 ml. Rastvori se u DMF-u (tačka 3.6.), sud se dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Pri temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.8.2. Rastvor standarda diklazurila, 50 µg/ml.

U sud zapremine 50 ml prenese se 5,00 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.8.1.), dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9. Interni standard: 2,6 dihlora-4-(4-hlorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2 (3H)- il) α-metilbenzen-acetonitril.

3.9.1. Osnovni rastvor internog standarda, 500 µg/ml.

Izmjeri se 25 mg internog standarda (tačka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 50 ml. Rastvori se u DMF-u (tačka 3.6.), sud se dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9.2. Rastvor internog standarda, 50 µg/ml.

U sud zapremine 50 ml prenese se 5,00 ml osnovnog rastvora internog standarda (tačka 3.9.1.), dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9.3. Rastvor internog standarda za premikse, p/1 000 mg/ml.

(p = nominalni udio diklazurila u premiksima, u mg/kg)

Izmjeri se p/10 mg internog standarda s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml, rastvori u DMF-u (tačka 3.6.) u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.6.), dopuni DMF-om do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.10. Kalibracioni rastvor

3.10.1. Kalibracioni rastvor, 1 µg/ml

Pipetom se prenese 1,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 17 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.2. Kalibracioni rastvor, 2 µg/ml

Pipetom se prenese 2,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 16 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.3. Kalibracioni rastvor, 3 µg/ml

Pipetom se prenese 3,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 15 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.4. Kalibracioni rastvor, 4 µg/ml

Pipetom se prenese 4,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 14 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.5. Kalibracioni rastvor, 5 µg/ml

Pipetom se prenese 5,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 13 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

Napomena: Kalibracioni rastvori (tačke 3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) obuhvataju koncentracije diklazurila u hrani za životinje u rasponu od 0,5 do 2,5 mg/kg pri upotrebi aktuelnog protokola

3.11. Kolona C₁₈ za ekstrakciju na čvrstoj fazi, npr. Bond Elut, veličina: 1 cc, masa apsorbenta: 100 mg.

3.12. Ekstrakcioni rastvarač: zakisjeljeni metanol.

Pipetom se prenese 5,0 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.7.) u 1 000 ml metanola (tačka 3.5.) i promiješa.

3.13. Mobilna faza za HPLC.

3.13.1. Eluent A: rastvor amonijum acetata i tetrabutilamonijum hidrogen sulfata.

Rastvori se 5 g amonijum acetata (tačka 3.2.) i 3,4 g TBHS-a (tačka 3.3.) u 1 000 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (tačka 3.4.).

3.13.3. Eluent C: metanol (tačka 3.5.).

4. Oprema

4.1. Mehanički šejker

4.2. Oprema za HPLC s ternarnim gradijentom

4.2.1. Kolona za tečnu hromatografiju, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm, 100 mm × 4,6 mm ili ekvivalentna

4.2.2. UV detektor s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektor s nizom dioda (DAD).

4.3. Rotacioni vakuum uparivač

4.4. Membranski filter, 0,45 µm

4.5. Štrcaljka za jednokratnu upotrebu

4.6. Vakuumski —manifold—

4.7. Ultrazvučno kupatilo

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan ni diklazuril ni druge interferentne materije. Slijepa proba hrane za životinje treba da bude slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost diklazurila ili interferentnih materija.

5.1.2. Test iskorišćenja

Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina diklazurila slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije od 1 mg/kg doda se 0,1 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.8.1.) u 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta, a prije nastavka (tačka 5.2.) miješanje se više puta ponovi.

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku

za analizu dodaje količina diklazurila slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodatog diklazurila, a iskorišćenje se izračunava oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Krmna smješa

Izmjeri se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 500 ml, doda 1,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) i 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smješa se tokom noći mučka na mješalici (tačka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U odgovarajuću staklenu posudu prenese se alikvot 20 ml supernatanta i razblaži sa 20 ml vode. Taj se rastvor prenese na SPE kolonu (tačka 3.11.) i filtrira pod vakuumom (tačka 4.5.). Kolona se ispere s 25 ml smješe ekstrakcionog rastvora (tačka 3.12.) i vode, 65 + 35 (V + V). Prikupljene se frakcije odbace, a komponente se eluiraju s 25 ml smješe ekstrakcionog rastvora (tačka 3.12.) i vode, 80 + 20 (V + V). Ova se frakcija uparava u rotacionom uparivaču (tačka 4.3) pri 60 °C skoro do suva. Ostatak se rastvori u 1,0 ml DMF-a (tačka 3.6), doda se 1,5 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa. Filtrira se kroz membranski filter (tačka 4.4.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Izmjeri se približno 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 500 ml, doda se 1,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.3.) i 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smješa se tokom noći mučka na mješalici (tačka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U odgovarajuću veliku staklenu tikvicu s okruglim dnom prenese se alikvot (10 000/p ml, p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksi) supernatanta. Upari se pod sniženim pritiskom na 60 °C u rotacionom uparivaču (tačka 4.3.) skoro do suva. Ostatak se rastvori u 10,0 ml DMF-a (tačka 3.6), doda se 15,0 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri

Sledeći uslovi se predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm ili ekvivalentna	
Mobilna faza:	Eluent A (tačka 3.13.1.):	vodeni rastvor amonijum acetata i tetrabutil amonijum hidrogen sulfata
	Eluent B (tačka 3.13.2.):	acetonitril
	Eluent C (tačka 3.13.3.):	metanol
Način eluiranja:	— linearni gradijent — početni uslovi: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — nakon 10 minuta, eluiranje sa gradijentom tokom 30 minuta do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Ispiranje 10 minuta sa B.	
Brzina protoka:	1,5 – 2 ml/min	
Zapremina injektiranja:	20 µl	
Talasna dužina detekcije:	280 nm	

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektiranjem kalibracionog rastvora koncentracije 2,0 µg/ml (tačka 3.10.2) sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retenciona vremena

5.3.2. Hromatografska analiza kalibracionih rastvora

Dvapat se injektira 20 µl svakog kalibracionog rastvora (tačke 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4. i 3.10.5.), odrede se i spoje pikovi diklazurila i internog standarda pripremi kalibracijska krivja na osnovu srednje vrijednosti visine ili površine pika diklazurila i srednje vrijednosti visine ili površine pika internog standarda u odnosu na koncentraciju diklazurila u kalibracijskim rastvorima (µg/ml).

5.3.3. Hromatografska analiza rastvora-uzorak

Dvapat se injektira 20 µl rastvora uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) i odredi srednja vrijednost visine ili površine pikova diklazurila i internog standarda.

6. Izračunavanje rezultata

6.1. Krmna sješa

Sadržaj diklazurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m} \text{ ili } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{10V}{m}$$

pri čemu je:

Visina (d,s) je visina pika diklazurila u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.)

Površina (d,s) je površina pika diklazurila u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.)

Visina (i,s) je visina pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1)

Površina (i,s) je površina pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.)

b je odsječak kalibracione krive nastale iz kalibracionih rastvora (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3.3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s tačkom 5.3.2.

a je nagib kalibracione krive nastale iz kalibracionih rastvora (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s tačkom 5.3.2.

m = masa testnog dijela u gramima

V je konačna zapremina u mililitrima ekstrakta uzorka nakon ponovnog rastvaranja u skladu s tačkom 5.2.1. (tj. 2,5 ml)

6.2. Premiksi

Sadržaj diklazurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = \frac{\frac{Height(d,s)}{Height(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p \text{ ili } w = \frac{\frac{Area(d,s)}{Area(i,s)} - b}{a} \times \frac{0.02V}{m} \times p$$

pri čemu je:

Visina (d,s) je visina pika diklazurila u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.)

Površina (d,s) je površina pika internog standarda u kalibracionom rastvoru (tačka 5.2.2.)

Visina (i,s) je visina pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.)

Površina (i,s) je površina pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.)

b je odsječak kalibracione krive nastale iz kalibracionih rastvora (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s tačkom 5.3.2.

a je nagib kalibracione krive nastale iz kalibracionih rastvora (3.10.1., 3.10.2., 3.10.3., 3.10.4. i 3.10.5.) u skladu s tačkom 5.3.2.

m = masa testnog dijela u gramima

V je konačna zapremina u mililitrima ekstrakta uzorka nakon ponovnog rastvaranja u skladu s tačkom 5.2.2. (tj. 25 ml)
p je nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksima

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda (DAD) kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.10.2.).

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.10.). Količina dodanog diklazurila mora biti slična količini diklazurila određenoj u ekstraktu uzorka.

Dovoljeno je povećanje samo visine pika diklazurila i internog standarda uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini visine mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika diklazurila ili pika internog standarda ekstrakta uzorka bez dodatka.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda (DAD)

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) Talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.

(b) Između 230 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100% relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.

(c) Između 230 i 320 nm, spektri krive rasta, najviše tačke pika i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 30 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila između 0,5–2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg za udio diklazurila između 2,5 – 5 mg/kg,
- 15 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila veći od 5 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80%.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Organizovana su dva međulaboratorijska ispitivanja. U prvoj, koju je sproveda druga grupa laboratorija 1994., analizirani uzorci bili su dva premiksa (O 100, A 100) i tri uzorka dopunske krmne smješe za živinu (L1, Z1, K1). Jedan uzorak premiksa je bio pomiješan s organskom matricom (O 100), a drugi s neorganskom matricom (A 100). Teoretski sadržaj iznosi 100 mg diklazurila na kg. Od laboratorija je zatraženo da svaki uzorak analiziraju jedanput ili dvaput. (Detaljnije informacije o prvoj međulaboratorijskoj studiji mogu se pronaći u Journal of AOAC International, svezak 77, br. 6, 1994., str. 1359–1361).

U drugom međulaboratorijskom ispitivanju analizirane su tri krmne smješe za živinu koje sadrže diklazuril u koncentracijama 0,9 mg/kg (MAT 1) i 1,5 mg/kg (MAT 2) i slijepa proba hrane za životinje (MAT 3). Detaljne informacije o drugoj studiji mogu se pronaći u Tehničkom izvještaju JRC-a (2016.) i u Journal of AOAC International, svezak 102, br. 2, 2019., str. 646–652.

Rezultati laboratorijskih analiza dati su u sljedećoj tabeli:

	Uzorak 1 A 100	Uzorak 2 O 100	Uzorak 3 L1	Uzorak 4 Z1	Uzorak 5 K1	Uzorak 6 MAT 1	Uzorak 7 MAT 2	Uzorak 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Srednja vrijednost	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	<LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	/
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	/
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	/
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	/
Nominalni udio (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	/

L = broj laboratorija
n = broj pojedinačnih vrijednosti
S_r = standardna devijacija ponovljivosti
CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti
S_R = standardna devijacija obnovljivosti
CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.
LOQ = Granica kvantifikacije

9. Napomena

Prethodno treba dokazati da je odziv diklazurila linearan u području koncentracija koje se mjere.

Za analizu diklazurila u krmnim smjesama s visokim učešćem masti (u ovu svrhu s učešćem masti većim od 12 %) analitička metoda može se zamijeniti drugim metodama koje se zasnivaju na HPLC-u, npr. metodom zasnovanom na tečnoj hromatografiji visoke djelotvornosti u interakciji sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS), pod uslovom da metoda zamjene ima jednaka svojstva efikasnosti (stepen iskorištenja, preciznost pri uslovima ponovljivosti i obnovljivosti).

Dio VII

ODREĐIVANJE LASALOCID NATRIJUMA

Natrijumova so polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi Streptomyces lasaliensis

Udio lasalocid natrijuma određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistriranih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tačne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- tečnom hromatografijom visoke djelotvornosti s reverznom fazom (HPLC) uz upotrebu spektrofotometrijskog (fluorescentnog) detektora, kako je opisano u tačkama od 1. do 8.

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa lasalocid natrijuma u hrani za životinje i premiksima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije iznosi 5 mg/kg, a granica kvantifikacije 10 mg/kg.

2. Princip

Lasalocid natrijum se ekstrahuje iz uzorka u zakiseljeni metanol i određuje tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu spektrofotometrijskog detektora.

3. Reagensi

- 3.1. Kalijum dihidrogen fosfat (KH₂PO₄).
- 3.2. Ortofosforna kiselina, m (m/m) = 85 %.
- 3.3. Rastvor ortofosforne kiseline, c = 20 %.
- 23,5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.2.) razblaži se vodom do 100 ml.
- 3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), m (m/m) = 99 %.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. Hlorovodična kiselina, gustina = 1,19 g/ml.

3.7. Rastvor fosfatnog pufera, $c = 0,01$ mol/l.

Rastvori se 1,36 g KH_2PO_4 (tačka 3.1.) u 500 ml vode (tačka 3.11.), doda se 3,5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.2.) i 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (tačka 3.4.). Rastvor ortofosforne kiseline (tačka 3.3.) pH vrijednost se podese na 4,0 i razrijedi vodom (tačka 3.11.) do 1 000 ml.

3.8. Zakiseljeni metanol.

U sud zapremine 1 000 ml prenese se 5,0 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.6.), dopuni metanolom (tačka 3.5.) do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svježe prije upotrebe.

3.9. Mobilna faza HPLC-a, rastvor fosfatnog pufera i metanola 5 + 95 (V + V).

Promiješa se 5 ml rastvora fosfatnog pufera (tačka 3.7.) sa 95 ml metanola (tačka 3.5.).

3.10. Lasalocid natrijum standardna supstanca garantovane čistoće, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (natrijumova so polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Osnovni rastvor standarda lasalocid natrijuma, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Izmjeri se 50 mg lasalocid natrijuma (tačka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml, rastvori u zakiseljenom metanolu (tačka 3.8.) i istim rastvorom dopuni do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svježe prije upotrebe.

3.10.2. Intermedijarni rastvor standarda lasalocid natrijuma, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Pipetom se prenese 10,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.10.1.) u sud zapremine 100 ml i zakiseljenim metanolom (tačka 3.8.) dopuni do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svježe prije upotrebe.

3.10.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.10.2.). Zakiseljenim se metanolom dopuni do oznake (tačka 3.8.) i promiješa. Ovi rastvori odgovaraju 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 μg lasalocid natrijuma na ml. Ovi se rastvori moraju pripremiti svježe prije upotrebe.

3.11. Voda, za HPLC

4. Oprema

4.1. Ultrazvučno kupatilo (ili vođeno kupatilo sa mućkanjem) sa kontrolom temperature

4.2. Membranski filteri, 0,45 μm

4.3. Oprema za tečnu hromatografiju visoke efikasnosti (HPLC) sa injekcionim sistemom odgovarajućim za injektovanje zapremina od 20 μl

4.3.1. Kolona za tečnu hromatografiju 125 mm $\times$ 4 mm, reverzna faza C_{18} , veličina čestica punjenja 5 μm ili ekvivalentna

4.3.2. Spektrofotometar s mogućnošću promjene talasne dužine (ekscitacije i emisije)

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Za sprovođenja testa iskorišćenja (tačka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni ni lasalocid natrijum, ni interferentne materije. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost lasalocid natrijuma i interferentnih materija.

5.1.2. Test iskorišćenja

Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine lasalocid natrijuma slične količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 100 mg/kg prenese se 10,0 ml osnovnog standardnog rastvora (tačka 3.10.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml i rastvor upari do približno 0,50 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta, a prije ekstrakcije, miješanje se više puta ponovi (tačka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku za analizu doda količina lasalocid natrijuma slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Ovaj se uzorak analizira zajedno sa uzorkom bez dodatog lasalocid natrijuma, a iskorišćenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Hrana za životinje

Izmjeri se 5–10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 250 ml s čepom. Pipetom se doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.8.). Poklopac se lagano zatvori i tikvica promućka radi disperzije uzorka. Tikvica se drži 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupatila i ohladi na sobnoj temperaturi. Ostavi se približno 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 μm (tačka 4.2.) u prikladnu posudu. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Izmjeri se približno 2 g neusitnjenog premiksa s preciznošću od 0,001 g i prenese u sud zapremine 250 ml. Doda se 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.8.), tikvica se protrese radi disperzije uzorka. Sud sa sadržajem drži se 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupatila i ohladi na sobnoj temperaturi. Zakiseljenim metanolom se (tačka 3.8.) razblaži do oznake i dobro promiješa. Ostavi se 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 μm (tačka 4.2.). Odgovarajuća zapremina čistog filtrata razblaži se zakiseljenim metanolom (tačka 3.8.), čime se dobija konačni test rastvor koncentracije približno 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lasalocid natrijuma. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri

Kao smjernice se predlažu sledeći uslovi, ali mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati:

Kolona za tečnu hromatografiju s povratnom fazom (tačka 4.3.1.), 125 mm $\times$ 4 mm	C_{18} , veličina čestica 5 μm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.9.):	Smjesa rastvora fosfatnog pufera (tačka 3.7.) i metanola (tačka 3.5.), 5 + 95 (V + V)
Brzina protoka:	1,2 ml/min
Talasna dužina detekcije:	Ekscitacija: 310nm
	Emisija: 419 nm
Zapremina za injektiranje:	20 μl

Stabilnost hromatografskog sistema provjerava se višekratnim injektiranjem kalibracionog rastvora koncentracije 4,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tačka 3.10.3.) sve dok se ne postignu konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna retenciona vremena.

5.3.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.10.3.) i za svaku koncentraciju izmjere se srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektiraju ekstrakti uzorka dobijeni u tački 5.2.1. ili 5.2.2. ovog dijela, pri čemu se koristi jednaka zapremina kao za kalibracioni rastvor i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova lasalocid natrijuma.

6. Izračunavanje rezultata

Iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova dobijenih injektiranjem rastvora uzorka (tačka 5.3.3.) određuje se koncentracija lasalocid natrijuma ($\mu\text{g}/\text{ml}$) iz kalibracione krive.

6.1. Hrana za životinje

Udio lasalocid natrijuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrijuma u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.) u µg/ml
V₁ = zapremina ekstrakta uzorka u skladu sa tačkom 5.2.1. u ml (tj. 100)
m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi

Udio lasalocid natrijuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

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

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrijuma u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.) u µg/ml
V₂ = zapremina ekstrakta uzorka u skladu sa tačkom 5.2.2. u ml (tj. 250)
f = faktor razblaženja u skladu s 5.2.2.
m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Metode koje se zasnivaju na spektrofotometriji manje su podložne interferencama od metoda kod kojih se koristi UV detekcija. Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom.

7.1.1. Ko-hromatografija

Ekstraktu uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.10.3.). Količina dodatog lasalocid natrijuma mora biti slična količini lasalocid natrijuma u ekstraktu uzorka. Smije se povećati samo visina pika lasalocid natrijuma uzimajući u obzir količine dodatog lasalocid natrijuma i razblaženje ekstrakta. Širina pika, na polovini visine, mora biti unutar ± 10 % početne vrijednosti širine pika dobijene iz ekstrakta uzorka bez dodatog lasalocid natrijuma.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15 % više vrijednosti za udio lasalocid natrijuma od 30 – 100 mg/kg,
- 15 mg/kg za udio lasalocid natrijuma od 100 – 200 mg/kg,
- 7,5 % više vrijednosti za udio lasalocid natrijuma veći od 200 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80%. Za obogaćene uzorke premiksa iskorišćenje mora iznositi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje⁵ u kojem je 12 laboratorija analiziralo 2 premiksa (uzorci 1 i 2) i 5 uzoraka hrane za životinje (uzorci 3 – 7). Svaki se uzorak analizirao dva puta. Rezultati su prikazani u donjoj tabeli:

	Uzorak 1 Premiks za piliće	Uzorak 2 Premiks za čurke	Uzorak 3 Granulat za čurke	Uzorak 4 Mrvice za piliće	Uzorak 5 Hrana za čurke	Uzorak 6 Hrana za živinu A	Uzorak 7 Hrana za živinu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrijednost [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
Nominalni udio [mg/kg]	5 000 (°)	16 000 (°)	80 (°)	105 (°)	120 (°)	50 (°)	35 (°)
Udio koji je naveo proizvođač.							
Hrana za životinje pripremljena u laboratoriji.							
L	=	broj laboratorija;					
n	=	broj pojedinačnih vrijednosti					
s _r	=	standardna devijacija ponovljivosti					
s _R	=	standardna devijacija obnovljivosti					
CV _r	=	koeficijent varijacije ponovljivosti u %					
CV _R	=	koeficijent varijacije obnovljivosti u %.					

⁵ - Analyst, 1995., 120, 2 175. - 2 180.

DIO VIII
ODREĐIVANJE AMPROLIJEV HIDROKLORIDA
1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinijev hidrid monohidroklorid

1. Predmet i područje primjene

Ova metoda omogućuje određivanje nivoa amprolija u hrani za životinje. Granica detekcije iznosi 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahuje smjesom metanola i vode. Nakon razrjeđivanja mobilnom fazom i membranske filtracije, udio amprolija određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s izmjenom katjona uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, za HPLC

3.3. Voda, za HPLC

3.4. Rastvor natrijum dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l

U graduisanom tikvici zapremine 1 000 ml rastvori se u vodi (tačka 3.3.) 13,80 g natrijum dihidrogen fosfat monohidrata, dopuni vodom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.5. Rastvor natrijum perhlorata, c = 1,6 mol/l.

U graduisanom tikvici zapremine 1 000 ml rastvori se u vodi (tačka 3.3.) 224,74 g natrijum perhlorat monohidrata, dopuni vodom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.6. Mobilna faza za HPLC (vidjeti napomenu pod tačkom 9.1.).

Smješa acetonnitrila (tačka 3.2.), rastvor natrijum dihidrogen fosfata (tačka 3.4.) i rastvor natrijum perhlorata (tačka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Prije upotrebe filtrira se membranskim filtrom 0,22 µm (tačka 4.3.), uklone se gasovi iz rastvora (npr. najmanje 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.4.)).

Standardna materija: čisti amprolij, 1-[(4-amino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridin hidrid, E 750 (tačka 9.2.)

3.7.1. Osnovni standardni rastvor amprolija, 500 µg/ml

Odmjeri se 50 mg amprolija (tačka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduisanu tikvicu zapremine 100 ml, otopi u 80 ml metanola (tačka 3.1) i tikvicu 10 minuta drži u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.4.).

Nakon obrade ultrazvukom rastvor se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.7.2. Intermedijarni standardni rastvor amprolija, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 5,0 ml osnovnog standardnog rastvora (tačka 3.7.1.) u graduisanu tikvicu zapremine 50 ml, dopuni do oznake rastvorom za ekstrakciju (tačka 3.8.) i promiješa.

Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.7.3. Kalibracioni rastvori

U seriju graduisanih tikvica zapremine 50 ml prenese se 0,5, 1,0, i 2,0 ml intermedijarnog standardnog rastvora (tačka 3.7.2.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (tačka 3.6.) i promiješa.

Ovi rastvori odgovaraju koncentracijama amprolija 0,5, 1,0 i 2,0 µg/ml.

Ovi rastvori se moraju pripremiti neposredno prije upotrebe.

3.8. Ekstrakcioni rastvarač

Smješa metanola (tačka 3.1.) i vode 2 + 1 (v + v)

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa sistemom za injektiranje zapremine od 100 µl

4.1.1. Kolona za tečnu hromatografiju 125 mm × 4 mm s izmjenom katjona, Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 ili 10 µm, ili ekvivalentna

4.1.2. UV detektor s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektor s nizom dioda

4.2. Membranski filter, materijal PTFE, 0,45 µm

4.3. Membranski filter, 0,22 µm

4.4. Ultrazvučno kupatilo

4.5. Mehanička mućkalica ili magnetna miješalica

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Za sprovođenje testa iskorišćenja (tačka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni ni amprolij ni interferirajuće materije. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost amprolija i interferirajućih materija.

5.1.2. Test iskorišćenja

Test iskorišćenja sprovedi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine amprolija slične onoj koja se nalazi u uzorku. Za dobijanje koncentracije od 100 mg/kg, prenese se 10,0 ml osnovnog standardnog rastvora (tačka 3.7.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml i smanji se isparavanjem do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepa probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta, ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (tačka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidjeti tačku 5.1.1.), test iskorišćenja može se sprovesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati količinom amprolija sličnom onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorišćenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Premiksi (sadržaj amprolija < 1 %) i hrana za životinje

Odmjeri se 5 – 40 g uzorka, zavisno od sadržaja amprolija. Sa preciznošću od 0,01 g, prenese se u konusnu tikvicu zapremine 500 ml i doda 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.8.).

Tikvica se stavi u ultrazvučno kupatilo (tačka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučnog kupatila i 1 sat mućka u mućkalici ili miješa magnetnom miješalicom (tačka 4.5.).

Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (tačka 3.6.) do sadržaja amprolija od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa (vidjeti napomenu pod tačkom 9.3.).

Filtrira se 5 – 10 ml tako razrijeđenog rastvora kroz membranski filter (tačka 4.2.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (sadržaj amprolija ≥ 1 %)

Odmjeri se 1 – 4 g premiksa, zavisno od učešća amprolija. Sa preciznošću od 0,001 g, prenese u konusnu tikvicu zapremine 500 ml i doda 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.8.).

Tikvica se stavi u ultrazvučno kupatilo (tačka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučnog kupatila i 1 sat mućka u mućkalici ili miješa magnetnom miješalicom (tačka 4.5.).

Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (tačka 3.6.) do sadržaja amprolija od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa. Kroz membranski filter filtrira se 5 – 10 ml tog rastvora (tačka 4.2.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri:

Sljedeći uslovi se predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati

Kolona za tečnu hromatografiju s povratnom fazom (tačka 4.1.1.), 125 mm × 4 mm	125mmx4mm sa izmjenom katjona, Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 µm ili 10 µm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.6.):	Smjesa acetonitrila (tačka 3.2.) rastvor rastvor natrijum dihidrogen fosfata (tačka 3.4.) i rastvor natrijum perhlorata (tačka 3.5.), 450+450+100 (v+v+v)
Brzina protoka:	0,7-1 ml/min
Talasna dužina detekcije:	264nm
Zapremina za injektiranje:	100 µl

Stabilnost hromatografskog sistema provjerava se višekratnim injektiranjem kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3) koncentracije 1,0 µg/ml sve dok se ne postignu konstantne visine pikova i konstantna retenciona vremena.

5.3.2. Kalibraciona kriva

Svaki kalibracioni rastvor se injektira više puta (tačka 3.7.3.) i za svaku koncentraciju odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova ekstrakcionog rastvarača, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.2.), pri čemu se koristi jednaka zapremina kao za ekstrakcioni rastvarač, a zatim se odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova amprolija.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova amprolija rastvora uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.3.2.).

Sadržaj amprolija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

pri čemu je:

V = zapremina ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.8.) u ml u skladu s tačkom 5.2. (tj. 200 ml);

c = koncentracija amprolija u ekstraktu uzorka (tačka 5.2.) u µg/ml;

f = faktor razrjeđenja u skladu s 5.2.;

m = masa testnog dijela u gramima

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka (tačka 5.2.) i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3.) koncentracije 2,0 µg/ml.

7.1.1 Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka (tačka 5.2.) doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3.). Količina dodatog amprolija mora biti slična količini amprolija u ekstraktu uzorka. Dozvoljeno je povećanje samo visine pika amprolija uzimajući u obzir dodatnu količinu i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovini maksimalne visine mora biti u okviru ± 10 % početne širine pika amprolija u neobogaćenom ekstraktu uzorka.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake u okviru granice određene različitosti sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi u okviru ± 2 nm.

(b) Između 210 i 320 nm spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra u okviru područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.

(c) Između 210 i 320 nm spektri uzlaznog dijela, vrha i silaznog dijela krive ekstrakta uzorka ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra u okviru raspona 10 – 100 % relativne apsorpcije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između spektara ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva uporedna određivanja sprovedena na istom uzorku ne smije prelaziti:

— 15 % više vrijednosti za sadržaj amprolija od 25 – 500 mg/kg,

— 75 mg/kg za sadržaj amprolija od 500 – 1 000 mg/kg,

— 7,5 % više vrijednosti za sadržaj amprolija veći od 1 000 mg/kg

7.3. Iskorišćenje

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorišćenje iznosi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijske studije

Sprovedena je međulaboratorijska studija u kojoj su analizirana tri uzorka hrane za živinu (uzorci 1–3), jedan uzorak mineralne mješavine (uzorak 4) i jedan uzorak premiksa (uzorak 5).

Rezultati su navedeni u sljedećoj tablici:

	Uzorak 1 (slijepi uzorak hrane za životinje)	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Srednja vrijednost [mg/kg]	/	45,5	188	5129	25140
S _r [mg/kg]	/	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	/	4,95	1,90	3,46	2,20
S _R [mg/kg]	/	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	/	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominalni udio [mg/kg]	/	50	200	5000	25000
L = broj laboratorija n = broj pojedinačnih vrijednosti S _r = standardna devijacija ponovljivosti CV _r = koeficijent varijacije ponovljivosti S _R = standardna devijacija obnovljivosti CV _R = koeficijent varijacije obnovljivosti					

9. Napomene

9.1 Ako uzorak sadrži tiamin, pik tiamina u hromatogramu pojavljuje se malo prije pika amprolija. U skladu sa ovom metodom, amprolij i tiamin se moraju razdvojiti. Ako se amprolij i tiamin ne razdvajaju na koloni (tačka 4.1.1.) korišćenju u ovoj metodi, metanolom se zamijeni do 50 % acetonitrila u mobilnoj fazi (tačka 3.6.).

9.2 Prema Britanskoj farmakopeji, najviše točke spektra rastvora amprolija ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) u hlorovodičnoj kiselini ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) nalaze se na 246 nm i 262 nm. ApSORPCIJA iznosi 0,84 na 246 nm i 0,80 na 262 nm.

9.3 Ekstrakt se uvijek mora razrijediti mobilnom fazom, u suprotnom bi se vrijeme retencije pika amprolija moglo znatno pomjeriti zbog promjena jonske sile

DIO IX ODREĐIVANJE NARAZINA

Sadržaj narazina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u standardu EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tečne hromatografije s postkolonskom derivatizacijom

DIO X ODREĐIVANJE NIKARBAZINA

Sadržaj nikarbazina određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije
- Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u standardu EN 15782 Hrana za životinje – Određivanja nikarbazina – Metoda tečne hromatografije visokog učinka.

DIO XI ODREĐIVANJE MONENZINA

Sadržaj monenzina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou niže od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u standardu EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tečne hromatografije s postkolonskom derivatizacijom.

DIO XII ODREĐIVANJE SALINOMICINA

Sadržaj salinomicina određuje se

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u standardu EN ISO 14183 Hrana za životinje – Određivanje količine monenzina, narazina i salinomicina – Metoda tečne hromatografije s postkolonskom derivatizacijom.

DIO XIII ODREĐIVANJE SEMDURAMICINA

Sadržaj semduramicina određuje se:

- analitičkom metodom utvrđenom u standardu EN 17299 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Provjera i određivanje odobrenih kokcidostatika na nivou aditiva i unakrsne kontaminacije 1 % i 3 % kao i neregistrovanih kokcidostatika i jednog antibiotika na nivou nižem od aditiva u hrani za životinje spregnutom tehnikom tečne hromatografije – Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS), ili
- metodom utvrđenom u standardu EN 16158 Hrana za životinje – Određivanje sadržaja semduramicina – Metoda tečne hromatografije upotrebom trojnog analitičkog pristupa

EN STANDARDI

Za službene kontrole hrane za životinje relevantni su sljedeći EN standardi:

EN ISO 30024 Hrana za životinje – Određivanje aktivnosti fitaze EN 17050 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje joda primjenom anjonskog izmjenjivača ICP-MS

EN 17550 Hrana za životinje: Određivanje karotenoida u krmnim smjesama i premiksima tečnom hromatografijom visokog učinka (HPLC) – UV detekcija (HPLC-UV)

EN 15784 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Bacillus* spp.

EN 15785 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Izolacija i brojanje *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Pedococcus* spp.

EN 15787 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Lactobacillus* spp. koji se upotrebljava kao aditiv u hrani za životinje

EN 15788 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. koji se upotrebljava kao aditiv u hrani za životinje

EN 15789 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Dokazivanje i određivanje broja *Saccharomyces cerevisiae* koji se upotrebljava kao aditiv u hrani za životinje

EN 15510 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, gvožđa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena i olova tehnikom ICP-AES (za analizu dodataka hrani za životinje kobalta i molibdena)

EN 15621 Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje kalcijuma, natrijuma, fosfora, magnezijuma, kalijuma, sumpora, gvožđa, cinka, bakra, mangana i kobalta tehnikom ICP-AES nakon razgradnje pod pritiskom (za analizu kobalta kao dodatka hrani za životinje)

EN 16159 Hrana za životinje – Određivanje selena atomskom apsorpcijskom spektrometrijom hidridni postupak (HGAAS) nakon mikrotalasne razgradnje (razgradnja sa 65 % azotnom kiselinom i 30 % vodik peroksidom)

EN 17053: Hrana za životinje: Metode uzorkovanja i analize – Određivanje elemenata u tragovima, teških metala i ostalih elemenata u hrani metodom ICP-MS (multimetoda) (za analizu kobalta, molibdena i selena kao dodataka hrani za životinje)".

**ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU NEPOŽELJNIH MATERIJU U HRANI ZA ŽIVOTINJE
ODREĐIVANJE NIVOVA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-a**

**Dio I
Metode uzimanja uzoraka i tumačenje rezultata analize**

1. Predmet i područje primjene

Uzorci za službenu kontrolu nivoa polihlorovanih dibenzo-p-dioksina (PCDD polihlorovanih dibenzofurana (PCDF), polihlorovanih bifenila sličnih dioksinu (PCB)⁽¹⁾ i PCB-a koji nisu slični dioksinu u hrani uzimaju se u skladu sa propisom kojim su uređeni zahtjevi za higijenu hrane za životinje i nepoželjne supstance u hrani za životinje.

Za potrebe ovog priloga primjenjuju se definicije utvrđene Pravilnikom o metodama za uzimanje uzoraka i laboratorijska ispitivanja hrane za životinje⁽²⁾. Skrining metode su metode koje se koriste za selekciju onih uzoraka sa nivoima PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu koje prelaze maksimalno dozvoljene količine. One omogućavaju troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata sa velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Skrining metode zasnivaju se na bioanalitičkim i GC/MS metodama. Rezultati analize uzoraka koji prelaze cut-off vrijednost za provjeru usklađenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom provjeravaju se kompletno ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrdnom metodom. Potvrđne metode su metode koje obezbjeđuju potpune ili dodatne informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantifikaciju maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a. Za potvrđne metode koriste se gasna hromatografija i masena spektrometrija visoke rezolucije(GC-HRMS) ili gasna hromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).

⁽¹⁾ Tabela faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za PCDD-ove, PCDF-ove i PCB-ove slične dioksinima: WHO-TEF-ovi za procjenu rizika za zdravlje ljudi na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za bezbjednost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005. (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241. (2006.)).

Kongener	Vrijednost TEF-a	Kongener	Vrijednost TEF-a
Dibenzo-p-dioksini („PCDD-ovi“) i dibenzo-p- furani („PCDF-ovi“)		„Dioksinima slični“ PCB-ovi Ne-orto PCB-ovi + mono-orto PCB-ovi	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne-orto PCB-ovi	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB- ovi	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Upotrijebljene skraćenice: „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = hekza; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = hlordibenzodioksin; „CDF“ = hlordibenzofuran; „CB“ = hlorbifenil.

(1) Tabela faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za PCDD-ove, PCDF-ove i PCB-ove slične dioksinima: WHO-TEF-ovi za procjenu rizika za zdravlje ljudi na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za bezbjednost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005. (Martin van den Berg et al., The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Toxicological Sciences 93(2), 223–241. (2006.)).

(2) Pravilnik o metodama za uzimanje uzoraka i laboratorijska ispitivanja hrane za životinje ("Službeni list CG", broj 78/16)

Načela opisana u smjernicama "Guidance Document on Measurement Uncertainty for laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry" poštuju se ako su primjenjiva.

(3) Pojam „gornji“ zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera. Pojam „donji“ zahtijeva primjenu nule za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera. Pojam „srednji“

zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera.

(4) Dvostruka analiza: odvojena analiza predmetnih analita upotrebom drugog alikvota istog homogenizovanog uzorka. Primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga 2, Dio III tačka 3. Međutim, za metode u kojima se upotrebljava 13C-obilježeni unutrašnji standard za odgovarajuće analite dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja nije usklađen. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Ako se analiza izvodi tokom incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se izostaviti u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću povezani

s incidentom kontaminacije i otkrivena je količina znatno veća od najveće dopuštene količine.

(5) Pojam 'gornji' zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam 'donji' zahtijeva primjenu nule za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam 'srednji' zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za obračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

(6) Primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. Dio III tačke 2. Međutim, za potvrdne metode u kojima se upotrebljava 13C-obilježeni unutrašnji standard za odgovarajuće analite dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja nije usklađen. Dvostruka analiza potrebna je kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Ako se analiza izvodi tokom incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se izostaviti u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu sljedivošću povezani sa incidentom kontaminacije i otkrivena je količina znatno veća od najveće dopuštene količine.

(7) Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka za najveće dopuštene količine.

(8) Bioanalitičke metode nijesu specifične za te kongenere koji su uključeni u sistem TEF. U izolatu uzorka mogu biti prisutni i druga strukturno povezana jedinjenja koja se vežu na receptor aromatskih ugljovodonika (AhR), što doprinosi opštem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati

nijesu procjena, već više pokazatelj vrijednosti TEQ u uzorku.

(9) 'Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry' (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), 'Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food' (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

(*1) U odnosu na najveće dopuštene količine.

(10) Trenutni zahtjevi zasnivaju se na TEF-ovima objavljenima u: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223–241. (2006.).

(11) Kongeneri za koje je često ustanovljeno da ko-eluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS uzimaju se u obzir i moguće interferencije fragmenata viših hloriranih kongenera.

(12) Načela opisana u smjernicama 'Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food' (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) poštuju se ako su primjenjiva.

(13) Preporučuje se niži doprinos nivoa reagensa u slijepoj probi od nivoa kontaminanta u uzorku. Laboratorija je odgovorna za kontrolu varijacije nivoa vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te

vrijednosti oduzete.

(14) Trenutni zahtjevi temelje se na TEF-ovima objavljenima u: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223–241. (2006.).

(15) Korišćenje svih šest 13C-označenih analoga prema zahtjevima internih standarda.

2. Usklađenost serije ili podserije sa maksimalno dozvoljenom količinom

2.1. U pogledu PCB-a koji nisu slični dioksinu

Serija se prihvata ako analitički rezultat ne prelazi maksimalno dozvoljenu količinu za PCB-a koji nijesu slični dioksinu. Serija nije u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje uzimajući u obzir mjernu nesigurnost⁽³⁾ ako gornji⁽⁴⁾ analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom⁽⁵⁾, prelazi maksimalno dozvoljene količine. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usaglašenosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu sa jednim od sljedećih pristupa:

- obračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95%. Serija odnosno podserija nije usaglašena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine.

Odredbe ove tačke primjenjuju se na rezultate analize dobijene iz uzorka za službene kontrole, a slučaju potrebe za dodatnim analizama ili referentne potrebe, primjenjuju se nacionalni propisi.

2.2. U pogledu PCDD/F-a i dioksina sličnih PCB-a

Serija je u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama ako rezultat pojedinačne analize:

- sprovedene skrining metodom sa sadržajem lažno usklađenih rezultata manjim od 5% ukazuje da nivo ne prelazi maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i sume PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje,

- sprovedene potvrdnom metodom ne prelazi maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i sume PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Za skrining testove potrebno je odrediti cut-off vrijednost za odluku o usklađenosti sa maksimalno dozvoljenim količinama određenim za PCDD/PCDF ili za sumu PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a.

Serija ili podserija nije u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje, ako gornji⁽⁶⁾ analitički rezultat dobijen potvrdnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom⁽⁷⁾, prelazi bez sumnje maksimalno dozvoljenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu sa jednim od sljedećih pristupa: - obračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95%. Serija odnosno podserija nije usklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine.

U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksinu slični PCB-i, tada se koristi suma procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a zasebno, kako bi se dobila suma PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a.

Odredbe ove tačke primjenjuju se na rezultate analize dobijene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe za dodatnim analizama ili referentne potrebe, primjenjuju se nacionalni propisi.

3. Rezultati koji prelaze nivo potreban za pokretanje postupka utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje

Nivoi potrebni za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u kojima je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i preduzeti mjere za smanjenje ili uklanjanje. Skринing metode uspostavljaju odgovarajuće cut-off vrijednosti za uzorke. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije sprovede se samo ako je pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrdnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost(8).

Dio II

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-a u određenoj hrani

1. Područje primjene

Zahtjevi iz ovog dijela primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polihlorovanih dibenzo-p-dioksina i polihlorovanih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih polihlorovanih bifenila (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe uključujući kontrole koje sprovodi subjekat u poslovanju sa hranom za životinje(9).

Monitoring prisustva PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u hrani može se vršiti sljedećim metodama:

Skринing metode

Cilj skринing metoda je odabir uzoraka sa nivoima PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koje prelaze maksimalno dozvoljene količine ili nivo potreban za pokretanje postupka. Skринing metode treba da omoguće efikasnu veliku propusnost uzoraka i povećanje mogućnosti za otkrivanje novih incidenata sa velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati, a mogu uključivati bioanalitičke metode i GCMS metode.

Skринing metode porede analitičke rezultate sa cut-off vrijednošću, iz kojih proizilazi DA ili NE odluka u pogledu mogućeg prelaženja maksimalno dozvoljene količine ili nivoa za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima za koje se sumnja da su neusklađeni sa maksimalno dozvoljenom količinom mora biti određena/potvrđena potvrdnom metodom.

Osim toga, skринing metode mogu pokazati nivo PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih skринing metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizičko-hemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Brojčano navedeni rezultati skринing metoda odgovarajući su za dokazivanje usklađenosti ili sumnje na neusklađenost ili prelaženja nivoa potreban za pokretanje postupka i pokazuju raspon nivoa u slučaju daljeg praćenja pomoću potvrdnih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količine prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena nivoa potrebnog za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljene količine.

(a) Potvrdne metode

Potvrdne metode omogućavaju određivanje količine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorku i obezbjeđuju punu informaciju na nivou kongenera. Stoga te metode omogućavaju kontrolu maksimalno dozvoljenih količina i potrebnog nivoa za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobijenih skринing metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenja vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene potrebnog nivoa za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljenih količina. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje usaglašenosti ili neusaglašenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. NAPOMENE:

Za obračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih materija u datom uzorku pomnože se njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF), a zatim sabere kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinu sličnih jedinjenja izraženih kao TEQ. Za potrebe ovog dijela B, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najniža koncentracija analita koja se može izmjeriti sa prihvatljivom statističkom sigurnošću, ispunjavajući kriterijume identifikacije koji su opisani u međunarodno priznatim standardima, npr. u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u metodi EPA 1613 i 1668 kako su revidovani.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

(a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi reagovanje instrumenta na dva različita jona koji se prate uz odnos signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu; ili

(b) ako zbog tehničkih razloga obračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, najniža tačka koncentracije na kalibracionoj krivoj koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičke serije uzoraka) odstupanje prosječnom faktoru relativnog odgovora izračunato za sve tačke na kalibracionoj krivoj u svakoj seriji uzoraka. LOQ se računa iz najniže kalibracione tačke uzimajući u obzir reagovanje (recovery) internih standarda i unos uzorka.

Bioanalitičke skринing metode ne daju rezultate na nivou kongenera, već samo navode⁽¹⁰⁾ vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), obzirom na to da sve komponente prisutne u ekstraktu uzorka koji proizvedu odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.

Skринing i potvrdne metode mogu se upotrijebiti za kontrolu određenog matriksa samo ako su dovoljno osjetljive za pouzdano utvrđivanje količina koje su na potrebnom nivou za pokretanje postupka ili maksimalno dozvoljene količine.

3. Zahtjevi za obezbjeđivanje kvaliteta

3.1. Mjere za sprečavanje uzajamne kontaminacije moraju se preduzeti tokom uzimanja uzoraka i analize.

3.2. Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u posudama od stakla, aluminijuma, polipropilena ili polietilena koje su odgovarajuće za čuvanje i ne utiču na sadržaj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz posuda.

3.3. Skladištenje i prevoz moraju biti sprovedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.

3.4. Svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljeti i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti, prema potrebi.

3.5. Od opšte je važnosti kontrola reagenasa, stakla i opreme, zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ.

3.7. Slijepu probu treba analizirati, sprovodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.

3.7. Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva stakla i rastvori koji se koriste u analizi ispitani i da su slobodni od jedinjenja koji interferiraju prilikom detekcije ciljanih komponenti u radnom obimu. Staklo treba isprati rastvorima ili/ grijati na temperaturama koje su pogodno za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih jedinjenja i interferirajućih jedinjenja sa njene površine.

3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na nivou maksimalno dozvoljene količine ili potrebnog nivoa za pokretanje postupka.

3.8. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za proizvode koji se ispituju moraju biti u skladu sa međunarodno priznatim smjernicama.

4. Zahtjevi za laboratorije

4.1. Laboratorije treba da su akreditovane u skladu sa zakonom, sa zahtjevima ISO vodiča br. 58 (radi obezbjeđenja analitičkog kvaliteta) i u skladu sa standardom MEST EN ISO/IEC 17025:2011 i u skladu sa propisom kojim je uređena bezbjednost hrane. Načela opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCDD/PCDF-ova i PCB-ova poštuju se ako su primjenjiva⁽¹¹⁾.

4.2. Laboratorije treba da kontinuirano učestvuju u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u relevantnim matriksima hrane i rasponima koncentracija.

4.3. Laboratorije koji sprovode skринing metode pri rutinskim kontrolama uzoraka treba da uspostave saradnju sa laboratorijima koji sprovode potvrdne metode zbog kontrole kvaliteta i potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF) i dioksinu slične PCB-e

5.1. Nizak radni opseg i granica kvantifikacije

Za PCDD/PCDF, osjetljivost određivanja mora biti na nivou pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih jedinjenja. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-a (posebno ne-orto supstituisanih kongenera) donja granica radnog obima mora dostići donje pikogramsko

područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-a, dovoljan je nivo kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

5.2.1. Potrebno je praviti razliku između PCDD-a, PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahiranih i vjerovatno interferirajućih jedinjenja, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), treba praviti razliku između različitih kongenera, na primjer: između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituisanih PCDD/PCDF i 12 dioksina sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.

5.2.2. Bioanalitičke metode moraju biti u stanju da detektuju ciljana jedinjenja kao suma PCDD/PCDF-a i/ili dioksina sličnih PCB-a. Prečišćavanje uzorka ima za cilj uklanjanje jedinjenja koji uzrokuju lažnu neusklađenost rezultata ili jedinjenja koji mogu smanjiti odgovor i prouzrokovati lažno usklađene rezultate.

5.3. Visoka tačnost (istinitost i preciznost, očito iskorišćenje pri biološkim testovima)

5.3.1. Kod metoda GC-MS određivanje treba da obezbjedi validnu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenog) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na osnovu nepouzdanе procjene rezultata TEQ-a. Tačnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u sertifikovanom materijalu i njegove sertifikovane vrijednosti, izražene kao procenat ove vrijednosti) i preciznost (RSDR relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobijenih u uslovima obnovljivosti (reproducibility)).

5.3.2. Kod bioanalitičkih metoda potrebno je odrediti očiglednu iskorišćenost pri biološkim testovima. Očigledna iskorišćenost pri biološkim testovima znači nivo BEQ-a izračunat iz kalibracione krive TCDD-a ili PCB-a 126, korigovana za vrijednost slijepe probe i zatim podijeljena sa vrijednosti TEQ-a, koja je određena potvrdnom metodom. Njegova namjena je ispravljanje faktora poput gubitka PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih jedinjenja tokom postupka ekstrakcije i prečišćavanja, povećavanje ili smanjivanje odgovora koekstrahiranih jedinjenja (agonistički i antagonistički efekti), kvalitet prilagođavanja krive, ili razlike između vrijednosti faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF) i relativne potencije (REP). Očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka, koji imaju reprezentativnu raspodjelu kongenera u blizini predmetnog nivoa.

5.4. Validacija u rasponu najveće dozvoljene količine i opšte mjere kontrole kvalitete

5.4.1. Laboratorije moraju dokazati efikasnost izvođenja metode u određenom rasponu maksimalno dozvoljene količine, npr. 0,5x, 1x i 2x većom količinom od maksimalno dozvoljene količine, sa prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tokom postupka validacije i/ili rutinske analize.

5.4.2. Redovne slijepe probe i ogledi sa dodavanjem (spajkovanjem) ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je sertifikovani referentni materijal) sprovode se kao mjere unutrašnje kontrole kvaliteta. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, ogledе sa dodavanjem (spajkovanjem) ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se sprovođenje analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. Granica određivanja (LOQ)

5.5.1. Za bioanalitičku skringing metodu, određivanje LOQ nije potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepe probu od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se nivo izvještavanja zbog postupanja sa uzorcima koji daju odgovor ispod tog nivoa. Za nivo izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepom probom sa odgovorom ispod radnog raspona. Stoga se izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljana jedinjenja blizu najniže zahtijevanog nivoa, a ne iz odnosa između signala i šuma ili slijepe probe.

5.5.2. Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu treba da bude približno jedna petina maksimalno dozvoljene količine.

5.6. Analitički kriterijum

Za pouzdane rezultate potvrdnih ili skringing metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriterijumi u rasponu maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao suma PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e:

	Skrining metode sa bioanalitičkim ili fizičko-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usklađenih rezultata (1)	<5%	
Istinitost		- 20% do +20%
Ponovljivost (repeatability) (RSDr)	<20%	
Unutar laboratorijska obnovljivost (RSDR)	< 25%	<15%
(1) U odnosu na maksimalno dozvoljene količine.		

5.7. Posebni zahtjevi za skringing metode

5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u tački 6 ovog dijela. Za ćelijske bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u tački 7 ovog dijela.

5.7.2. Laboratorije koje sprovode skringing metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju sa laboratorijama koji sprovode potvrdnu metodu.

5.7.3. Tokom rutinske analize potrebno je sprovesti provjeru mogućnosti skringing metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora sprovesti program za kontrolu usklađenosti rezultata.

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja ćelijskog odgovora i citotoksičnosti:

20% izolata uzoraka mjeri se u rutinskom skringing pregledu bez i sa dodatim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara maksimalno dozvoljene količini ili nivou potrebnog za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u ekstraktu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka sa dodatkom (spajkom) poredi se sa sumom koncentracija ekstrakta bez dodatka i koncentracije koja je dodata (spajkovana). Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25% manja od izračunate (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i da te rezultate treba podržati potvrdnom analizom GC-HRMS. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvaliteta.

5.7.5. Kontrola kvaliteta usklađenih uzoraka:

Otprike od 2% do 10% usklađenih uzoraka, zavisno od matriksa uzorka i laboratorijskog iskustva, biće potvrđena GC-HRMS analizom.

5.7.6. Određivanje učestalosti lažno usklađenih rezultata na temelju podataka QC:

Određuje se učestalost lažno usklađenih rezultata dobijenih skringing metodama analize uzoraka ispod i iznad maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usklađenih rezultata mora biti ispod 5%. Kada je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matriksu/grupi matriksa dostupno iz kontrole kvaliteta usklađenih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usklađenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim

probama ili tokom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2x maksimalno dozvoljene količine (MDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su skринing metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze nivo potreban za pokretanje postupka, kriterijum za određivanje lažno usklađenih rezultata je maksimalno dozvoljena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrđne metode.

5.7.7. Mogući neusklađeni rezultati iz skринing metode moraju se uvijek provjeriti komplet ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrđnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Kod skринing metoda učestalost „lažnih usklađenih rezultata“ je dio rezultata za koje je potvrđeno da su usklađeni potvrđnom analizom, dok je prethodnom skринing metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usklađen. Međutim, procjena prednosti skринing metode zasniva se na upoređivanju lažno usklađenih rezultata sa ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba skринing metode korisna.

5.7.8. Bioanalitičke metode moraju barem u uslovima validnosti tačno pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ. I kod bioanalitičkih metoda sprovedenih u uslovima ponovljanja, unutar-laboratorijska ponovljivost RSDr je uobičajeno manja nego obnovljivost RSDR.

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati metode GC-MS za skринing ili potvrđne metode

6.1. Prihvatljive razlike između gornje i donje granice nivoa WHO-TEQ

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20% da bi se potvrdilo prelaženje maksimalno dozvoljene količine ili u slučaju potrebe prelaženja nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

6.2. Kontrola iskorišćenja (Control of recoveries)

6.2.1. Dodavanje ¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituisanih internih standarda za PCDD/PCDF i ¹³C-označenih internih standarda za dioksinu slične PCB-e je potrebno sprovesti na samom početku analize, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorirane homologne grupe za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne grupe za dioksinima slične PCB-e (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani jon u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a odnosno dioksinima sličnih PCB-a). U slučaju potvrđnih metoda koristi se svih 17

¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituisanih internih standarda za PCDD/PCDF-e i svih 12 ¹³C-označenih internih standarda za dioksinu slične PCB-e.

6.2.2. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ¹³C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajući

kalibracioni rastvori.

6.2.3. Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10% masti, interni standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog porijekla u kojoj je sadržaj masti veći od 10%, interni standardi se mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se sprovesti odgovarajuće vrednovanje efikasnosti ekstrakcije, što zavisi od toga dodaje li se interni standard prije ili nakon ekstrakcije masti, i o tome izražavaju li se rezultati na sadržaj masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

6.2.4. Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorišćenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolisati iskorišćenje. Za potvrđne metode, iskorišćenje pojedinačnih internih standarda mora biti u rasponu između 60% i 120%. Manje ili veće iskorišćenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10% ukupne TEQ vrijednosti (dobijene na osnovu zbira PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). Za skринing metode GC-MS iskorišćenje mora biti u rasponu između 30% i 140%.

6.3. Uklanjanje interferirajućih materija

Odvajanje PCDD/PCDF-a od interferirajućih hlorovanih jedinjenja kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i hlorovani difenil eteri se sprovodi pomoću odgovarajućih hromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone sa florisilom, aluminijum-oksidiom i/ili aktivnim ugljem).

- Razdvajanje izomera gasnom hromatografijom mora biti zadovoljavajuće (<25% od pika do pika između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivom

Raspon kalibracione krive mora obuhvatati relevantni raspon maksimalno dozvoljenih količina ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrđne metode

- Za GC-HRMS:

U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10000 za cijeli maseni raspon pri 10% najmanjeg razmaka između dva pika vrijednosti jednakog intenziteta. Ispunjavanje daljih kriterijuma za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim standardima, na primjer u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

- Za GC-MS/MS:

Praćenje barem dva specifična prekursora jona, svakog sa jednim posebnim odgovarajućim prelaznim jonom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

Najveće dozvoljeno odstupanje relativnih intenziteta jona od ±15% za odabranu tranziciju jona produkta u poređenju sa izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjek iz kalibracionih normi), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak gasa kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dovoljna da dva pika razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja ispitivanih analita.

Ispunjavanje zahtjeva međunarodno priznatih standarda, na primjer u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u revidiranim metodama EPA 1613 i 1668, osim obaveze da se koristi GC-HRMS.

7. Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode

Bioanalitičke metode su metode zasnovane na upotrebi bioloških načela kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na bazi receptora ili imunološki testovi. Skринing metoda klasifikuje uzorak kao usklađen ili kao sumnjiv da nije usklađen. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ upoređuje se sa cut-off vrijednošću. Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se usklađenima, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu usklađeni, što zahtijeva analizu obezbjeđujući učestalost lažno usklađenih rezultata ispod 5% i prihvatljivu učestalost lažno neusklađenih rezultata. Kako su maksimalno dozvoljene količine odvojene za PCDD/PCDF i za zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, provjera usklađenosti uzoraka bez frakcionisanja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-e kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze nivoa potrebne za pokretanje postupka, odgovarajući procenat nivoa potrebnog za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost. Kod nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze nivo izvještavanja (tačke 7.1.1. i 7.1.6.)

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opšti zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracione krive za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krive pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je

raspon u kojem je CV manji od 15%. Donji dio radnog raspona (nivo izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC70 (70% najveće efikasne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15%. Radni raspon se određuje tokom validacije. Cut-off vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.

- Standardni rastvori i ekstrakti uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardni rastvori ili ekstrakti kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na temelju CV<15%.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivom

- Nivoi u uzorcima mogu se procijeniti upoređivanjem odgovora na ispitivanje s kalibracionom krivom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-a/dioksinu sličnih PCB-a) za obračun BEQ vrijednosti u ekstraktu i kasnije u uzorku.

- Kalibraciona kriva sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) sa dovoljno koncentracija u donjem dijelu krive (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagodljivosti krive u radnom rasponu. Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagođavanja pri nelinearnoj regresiji. Bolje prilagođavanje postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krive (npr. smanjivanjem zbira kvadrata rezidua).

- Procijenjena vrijednost u ekstraktu uzorka zatim se koriguje za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matriksa/rastvora (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvora i hemikalija) i za očito iskorišćenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka). Za korekciju iskorišćenja, očigledno iskorišćenje treba uvijek biti unutar zahtjevanog raspona. Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorišćenja treba da su usklađeni sa zahtjevima iz tačke 7.2. ovog dijela.

7.1.2.2. Kalibracija sa referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se da se u blizini ciljnog nivoa upotrebi kalibraciona kriva pripremljena iz bar četiri referentna uzorka jedan matriks slijepe probe i tri referentna uzorka sa 0,5x, 1,0x i 2,0x većom vrijednosti od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka) zbog čega korekcija vrijednosti slijepih proba i iskorišćenja više nije potrebna. U ovom slučaju se može odgovor testa koji odgovara 2/3 maksimalno dozvoljene količine izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze nivoe potrebne za pokretanje postupka, odgovarajući procenat nivoa potrebnog za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a

Ekstrakti se mogu podijeliti u frakcije koje sadrže PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibraciona kriva PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-e.

7.1.4. Očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima

„Očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima” izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka i izražava se kao procenat vrijednosti BEQ u komparaciji sa vrijednošću TEQ. Zavisno od vrste ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF-ova (12), razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-e mogu prouzrokovati manje očito iskorišćenje za dioksinu slične PCB-e u poređenju s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se sprovodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a očito iskorišćenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-e 20% do 60%, za PCDD/PCDF-e od 50% do 130% (rasponi važe za kalibracionu krivu TCDD). S obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-a sumi PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a može varirati kod različitih matriksa i uzoraka, očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima za parametar sume odražava ove raspone koji iznose od 30% do 130%. Bilo koja implikacija bitno revidiranih vrijednosti TEF-a na zakonodavstvo Unije za PCDD/PCDF-e i dioksinu slične PCB-e zahtijeva reviziju ovih raspona.

7.1.5. Kontrola iskorišćenja prečišćavanja

Gubitak jedinjenja tokom prečišćavanja uzorka provjerava se tokom validacije. Slijepa proba sa dodatkom mješavine različitih kongenera se podvrgava prečišćavanju (najmanje n=3), a iskorišćenje i varijabilnost provjeravaju se potvrdnom analizom. Iskorišćenje iznosi od 60% do 120% naročito za kongenere koji doprinose više od 10% vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Nivoi izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, nivo izvještavanja se određuje na osnovu odgovarajućih matriksa uzoraka koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovi kalibracione krive standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krive. Efekti ekstrakcije i prečišćavanja se uzimaju u obzir. Nivo izvještavanja se određuje značajno iznad postupka sa uzorcima slijepe probe (najmanje tri puta više).

7.2. Korišćenje referentnih uzoraka

7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju uzorke matriksa, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e oko maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potreban za pokretanje postupka.

7.2.2. Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje uključuje se jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa proba datog matriksa i jedan referentni uzorak sa maksimalno dozvoljenom količinom ili na nivo potrebnom za pokretanje postupka. Ovi uzorci se ekstrahuju i analiziraju istovremeno u istim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što obezbjeđuje ispravnost testa, a uzorci se mogu koristiti za korekciju slijepa probe i iskorišćenja.

7.2.3. Referentni uzorci koji se odaberu za korekciju iskorišćenja su reprezentativni za ogledne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5x i 2x veće od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka. Ako se kombinuju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u oglednim uzorcima (tačka 7.1.2.2.)

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bionalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracijskim ogledima u matriksu, koji uključuju referentne uzorke sa dodatkom (spajkom) 0, 0,5x, 1x i 2x maksimalno dozvoljene količine (MDK) sa šest ponavljanja na svakom nivou (n=24)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorišćenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali se moraju provjeravati u svakoj seriji ispitivanja u skladu sa tačkom 7.2.2. ovog dijela.+

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o usklađenosti uzorka sa maksimalno dozvoljenim količinama ili za kontrolu nivoa potrebnog za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na dotičnu maksimalno dozvoljenu količinu ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-e i za dioksinu slične PCB-e ili za sumu PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a. Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepa probe i za iskorišćenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na bazi 95% nivoa povjerenja, što znači da je sadržaj lažno usklađenih rezultata <5% i na osnovu RSD R<25%. Odlučujuća granica potvrdne metode je maksimalno dozvoljene količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način:

7.3.1. Korišćenje donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (\bar{x}_1 - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

BEQDL - BEQ koji odgovara odlučujućoj granici potvrđne metode, koja je maksimalno dozvoljena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost

$s_{y,x}$ - standardna devijacija rezidua

$t_{\alpha, f=m-2}$ - student faktor ($\alpha=5\%$, f =stepeni slobode, jednostrani)

m - ukupan broj kalibracionih tačaka (indeks j)

n - broj ponavljanja na svakom nivou

$\bar{x}'$ - koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske tačke i određena potvrđnom metodom

$\bar{x}$

- srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibracionih uzoraka

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$$

parametar zbira kvadrata, i = indeks za kalibracionu tačku i $j=1$

7.3.2. Obračun iz bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrđne metode, kao donja krajnja tačka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

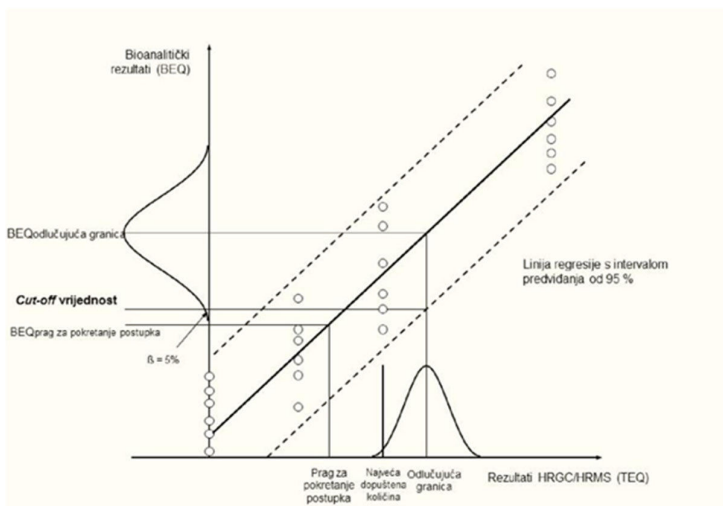
gdje je:

SD_R - standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQDL, izmjereno u unutar laboratorijskim uslovima obnovljivosti

7.3.3. Obračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, što se zasniva na zapažanju o kretanju vrijednost oko cut-off vrijednosti datih u tač. 7.3.1. ili 7.3.2. ovog dijela.

Obračun cut-off vrijednosti na osnovu 95% nivoa povjerenja, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata $<5\%$ i na osnovu $\text{RSD } R < 25\%$:

- 1) iz donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode;
- 2) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrđne metode kao donja krajnja tačka distribucije (na slici prikazana krivom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.



7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti

Cut-off vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka sa različitim uzorcima matriksa/kongenera mogu biti veće od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobijene kada je potrebno kontrolisati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim slučajevima se cut-off vrijednosti izračunaju iz $\text{RSD}_R=25\%$, ili se daje prednost 2/3 maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvodljivosti (Performance characteristic)

7.4.1. U bioanalitičkim metodama ne mogu se koristiti interni standardi, već se sprovede ispitivanja ponavljanja kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponavljanje mora biti manja od 20%, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25%. To se bazira na nivoima izračunatih u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje.

7.4.2. U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i nivoa na cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti.

7.4.3. Moraju se utvrditi ciljna jedinjenja, moguće interference i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.

7.4.4. Procenat standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunat iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju ekstrakta uzorka ne smije biti iznad 15%.

7.4.5. Nekorrigovani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri maksimalno dozvoljenoj količini ili nivou potrebnom za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvodljivosti bioanalitičke metode u konstantnom vremenskom periodu.

7.4.6. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa uzorcima slijepe probe i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se obezbjedilo da je izvodljivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepom probom u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolisati kako bi se izbjegli lažno usklađeni rezultati kada se oduzimaju.

7.4.7. Rezultati analiza sumnjivih uzoraka dobijenih potvrdnim metodama i 2 do 10% usklađenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matriksu) sakupljaju se i koriste za procjenu izvodljivosti skrining metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validovane matrikse.

7.4.8. Uspješna izvodljivost metoda može se takođe dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2x maksimalno dozvoljene količine, mogu takođe biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata, ako laboratorija može dokazati uspješnu izvodljivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.

7.4.9. Tokom incidenata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir specifičan matriks i kongenere koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. Izvještavanje o rezultatima

8.1. Potvrdne metode

8.1.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dozvoljava, analitički rezultati moraju sadržati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-a i kongenera dioksina sličnih PCB-a i treba ih definisati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

8.1.2. U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksina sličnih PCB-a.

8.1.3. Iskorišćenja individualnih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su van raspona iz tačke 6.2.5. ovog dijela, u slučaju da je dobijen rezultat veći od maksimalno dozvoljene količine (u tom slučaju iskorišćenje za jednu od dvije duple analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.

8.1.4. S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađivanju uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo povjerenja od 95%. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksini slični PCB-i, tada se suma procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a koristi za sumu PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a.

8.1.5. Rezultati se iskazuju u istim mjernim jedinicama i zaokružuju barem na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine u skladu sa propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje.

8.2. Bioanalitičke skrining metode

8.2.1. Rezultat skrining metode izražava se kao usklađen ili se za njega sumnja da je neusklađen („sumnjiv“).

8.2.2. Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili dioksine slične PCB-e može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).

8.2.3. Za uzorke sa odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su „ispod granice izvještavanja“. Za uzorke sa odgovorom iznad radnog raspona navodi se da „prelaze radni raspon“ i odgovarajuća količina do gornjeg dijela radnog raspona navodi se u BEQ.

8.2.4. Za svaku vrstu matriksa uzorka u izvještaju se navodi maksimalna dozvoljena količina ili nivo potreban za pokretanje postupka na kojoj se procjena zasniva.

8.2.5. U izvještaju se navodi vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.

8.2.6. U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksina sličnih PCB-a

8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usklađeni, u izvještaj treba uključivati napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a u tim uzorcima sa povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

8.2.8. Neusklađeni rezultati navode se samo iz potvrdne metode.

8.3. Fizičko-hemijske skrining metode

8.3.1. Rezultat skrining metode izražava se kao „usklađen“ ili se za njega „sumnja da je neusklađen“ (sumnjiv).

8.3.2. Za svaku vrstu uzorka matriksa u izvještaju se navodi najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojima se temelji procjena.

8.3.3. Navode se količine za pojedine PCDD/PCDF-ove i/ili dioksine slične PCB kongenera i TEQ vrijednosti izražene kao donje, gornje i srednje. Rezultati se izražavaju istim jedinicama i zaokružuju se barem na isti broj decimalnih mjesta kao najveće dozvoljene količine u skladu sa propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje.

8.3.4. Iskorištavanje pojedinih internih standarda navedena su ako su van raspona navedenog u tački 6.2.5., u slučaju da je dobijen rezultat veći od najveće dozvoljene količine (iskorišćenje za jednu ili dvije dvostruke analize) i u drugim slučajevima na zahtjev.

8.3.5. U izvještaju se navodi primijenjena GC-MS metoda.

8.3.6. U izvještaju je potrebno uključiti metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF i dioksina sličnih PCB-ova.

8.3.7. U slučaju uzorka za koje se sumnja da nijesu usklađeni, izvještaj uključuje napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova u tim uzorcima sa povećanim nivoima određuje/potvrđuje se potvrdnom metodom.

8.3.8. O neusklađenosti odlučuje se poslije potvrdne analize.

Dio III

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za službenu kontrolu količina PCB-a koji nijesu slični dioksini u hrani za životinje

1. Područje primjene

Analiza hrane za životinje za kontrolu nivoa PCB-ova koji nisu slični dioksini u i pogledu pripreme uzoraka i analitičkih zahtjeva za druge regulatorske svrhe, uključujući kontrole koje sprovodi subjekt u poslovanju hranom za životinje usklađeni su sa Uredbom o bližim zahtjevima za higijenu hrane za životinje.

2. Metode detekcije koje se koriste

Gasna hromatografija/elektron apsorbujući detektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC- HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrda traženih analita

3.1. Relativno retenciono vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25\%$).

3.2. Gasno hromatografska separacija svih šest indikatorskih PCB-a od interferirajućih materija, posebno ko-eluiranih PCB-a, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusklađenost se mora potvrditi ⁽¹³⁾.

3.3. Zahtjevi za tehnike GC-MS Monitoring najmanje:

(a) dva specifična jona za HRMS;

(b) tri specifična jona za LRMS;

(c) 2 specifična prekursor jona, svakog s jednim posebnim odgovarajućim prelaznim jonom produkta za MS-MS.

Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata: Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracioni standard za ciljni jon (jon s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrdnih jona: $\pm 15\%$.

3.4. Zahtjevi za tehnike GC-ECD

Potvrda rezultata koji prelaze dozvoljena odstupanja sa dvije GC kolone sa stacionarnim fazama različite polarnosti.

4. Prikazivanje izvođenja metode

Performanse metode se mogu validovati u obim maksimalno dozvoljene količine (0,5 do 2 puta više od maksimalno dozvoljene količine) sa prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize.

5. Granica kvantifikacije

Vrijednosti slijepe probe⁽¹⁴⁾ ne smiju biti veće od 30% nivoa kontaminacije što odgovara maksimalno dozvoljenoj količini⁽¹⁵⁾.

6. Kontrola kvaliteta

Redovne slijepe probe, analize uzoraka sa dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim testovima sa različitim matriksima uzoraka.

7. Kontrola iskorišćenja

7.1. Korišćenje pogodnih internih standarda sa fizičko-hemijskim svojstvima koji odgovaraju analitima od interesa.

7.2. Dodavanje internih standarda:

Dodavanje proizvoda (prije ekstrakcije i postupka čišćenja).

7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-a označenih izotopima:

(a) korekcija rezultata za iskorišćenje internih standarda;

(b) iskorišćenje izotopski označenih internih standarda je između 60 i 120%;

(c) manje ili veće iskorišćenje je prihvatljivo za pojedinačne kongenere koji učestvuju sa manje od 10% u ukupnoj sumi.

7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:

- (a) kontrola iskorišćenja internih standarda za svaki uzorak;
- (b) prihvatljivo iskorišćenje internih standarda između 60 i 120%;
- (c) korekcija rezultata u pogledu iskorišćenja internih standarda.

7.5. Iskorišćenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka sa dodatkom ili kontrolnih uzoraka sa koncentracijama u rasponu maksimalno dozvoljene količine. Prihvatljivo iskorišćenje za te kongenere je između 60 i 120 %.

8. Zahtjevi za laboratorije

Laboratorije treba da su akreditovane u skladu sa zakonom, sa zahtjevima ISO vodiča br. 58 (radi obezbjeđenja analitičkog kvaliteta) i u skladu sa standardom MEST EN ISO/IEC 17025:2011 i u skladu sa propisom kojim je uređena bezbjednost hrane. Načela opisana u tehničkim smjernicama za procjenu mjerne nesigurnosti i granica kvantifikacije za analizu PCB-ova poštuju se ako su primjenjiva.

9. Karakteristike izvodljivosti: kriterijum za sumu PCB-a koji nijesu slični dioksinima pri najvećoj dozvoljenoj količini

	Razređivanje izotopa- masena spektometrija (-)	Ostale tehnike
Istinitost	-20 do 20%	-30 do +30%
Srednja preciznost (RSD)	≤ 15%	≤ 20%
Razlika između izračunavanja gornje i donje granice	≤ 20%	≤ 20%

10. Izvještaj o rezultatima

10.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dozvoljava, analitički rezultati moraju sadržati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definisati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaju uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

10.2. U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-a.

10.3. Iskorišćenja pojedinih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su van raspona datog u tački 7 ovog dijela, u slučaju da je dobijeni rezultat veći od maksimalno dozvoljenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.

10.4. S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, taj je parametar takođe potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo povjerenja od 95%.

10.5. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti najmanje na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine, u skladu sa propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje.

ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG PORIJEKLA ZA SLUŽBENU KONTROLU HRANE ZA ŽIVOTINJE

1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Određivanje sastojaka životinjskog porijekla u hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećim metodama.

Svjetlosna mikroskopija ili lančana reakcija polimerazom (PCR) omogućavaju otkrivanje prisutnosti sastojaka životinjskog porijekla u hranivima i smješama za ishranu životinja s tim da ne omogućavaju izračunavanje količine takvih sastojaka u hranivima i smješama za ishranu životinja.

Obje metode imaju granicu detekcije ispod 0,1 % (m/m)

PCR metoda omogućuje određivanje taksonomske grupe sastojaka prisutnih u hranivima i smješama za ishranu životinja. Zavisno od vrste hrane za životinje koja se ispituje, ove metode mogu se koristiti u okviru jedinstvenog protokola samostalno ili zajedno u skladu sa standardnim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavila referentna laboratorija za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURLAP).

2.1. Svjetlosna mikroskopija

2.1.1. Princip

Sastojci životinjskog porijekla koji mogu biti prisutni u hranivima i krmnim smješama poslati na analizu identifikuju se na temelju tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika kao što su mišićna vlakna i ostale čestice mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinje, krv, kapljice mlijeka, kristali laktoze, perje, ljuske jaja, riblje kosti i krljušt.

Mikroskopska ispitivanja sprovode se nakon pripreme uzoraka sedimentacijom.

Uzorci se podvrgavaju postupku sedimentacije na sljedeći način:

- (a) za detekciju sastojaka životinjskog porijekla, osim od kopnenih bezkičmenjaka, koristi se postupak jednostruke sedimentacije tetrahloretilenom (TCE);
- (b) za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka, koristi se postupak dvostruke sedimentacije petroleterom/ tetrahloretilenom (PE/TCE).

2.1.2. Reagensi i oprema

2.1.2.1. Reagensi

2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentrovanje 2.1.2.1.1.1. Tetrahloretilen (gustina 1,62)

2.1.2.1.1.2. Vrelašte petroletera (PE) 40-60° C

2.1.2.1.2. Reagens za bojenje

2.1.2.1.2.1. Rastvor alizarin crveno (rastvori se 2,5 ml 1M hlorne kiseline u 100 ml vode i tom se rastvoru doda 200 mg alizarin crvenog)

2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata 2.1.2.1.3.1. Baza

(NaOH 2,5% w/v ili KOH 2,5% w/v)

2.1.2.1.3.2. Glicerol (nerazrijeđen, viskoznost: 1490 cP) ili sredstvo za pripremu preparata sa ekvivalentnim svojstvima za pripremu privremenih preparata.

2.1.2.1.3.3. Norland® Optical Adhezive 65 (viskoznost 1200 cP) ili smola sa istim svojstvima za pripremu trajnih preparata 2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata sa osobinama bojenja

2.1.2.1.4.1. Lugolov rastvor (rastvori se 2 g kalijum jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda) 2.1.2.1.4.2. Cistinski reagens (2 g olovo acetate, 10 g NaOH/100 ml vode)

2.1.2.1.4.3. Fehlingov reagens (pripremi se prije upotrebe od jednakih dijelova (1/1) osnovnih rastvora A i B. Rastvor A. 6,9 g bakar (II) sulfata pentahidrata rastvori se u 100 ml vode. Rastvor B. 34,6 g kalijum-natrijum tartarata tetrahidrata i 12 g NaOH rastvori se u 100 ml vode)

2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin vodonik peroksid (rastvori se u 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml glacijalne sirćetne kiseline i 150 ml vode. Prije upotrebe izmješaju se 4 dijela ovog TMB rastvora s jednim dijelom 3 % vodonik peroksida 2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje

2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (tehnički čist) 2.1.2.1.5.2. Aceton

(tehnički čist) 2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje

2.1.2.1.6.1. Komerijalni rastvor natrijum hipohlorata (9-14 % aktivnog hlora)

2.1.2.2. Oprema

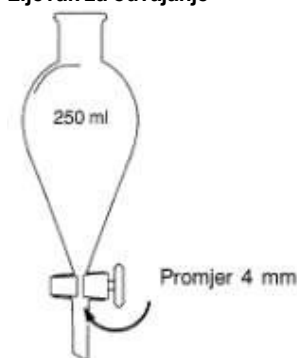
2.1.2.2.1. Analitička vaga sa preciznošću od 0,001 g

2.1.2.2.2. Pribor za mljevenje: nož ili mlin sa rotorom. Ako se koristi mlin sa rotorom zabranjena je upotreba mlinskih sita ≤ 0,5 mm.

2.1.2.2.3. Sita sa mrežicom kvadratnih očica širine 0,25 mm i 1 mm. Osim kod prethodnog prosijavanja uzorka, promjer sita ne smije biti veći od 10 cm kako bi se izbjegao gubitak materijala. Kalibracija sita nije potrebna.

2.1.2.2.4. Konusni stakleni lijevak za odvajanje zapremine 250 ml sa teflonskom slavinom ili slavinom od brušenog stakla. Prečnik otvora slavine mora biti ≥ 4 mm. Umjesto toga, za jednokratno taloženje TCE-om, može se upotrijebiti čaša sa konusnim dnom pod uslovom da je laboratorija dokazala da su granice detekcije ekvivalentne onima kada se koristi konusni stakleni lijevak za odvajanje.

Lijevak za odvajanje



2.1.2.2.5. Stereomikroskop koji obuhvata najmanje 6,5 × do 40 × finalni obim povećanja

2.1.2.2.6. Sastavljeni mikroskop koji obuhvata najmanje 100 × do 400 × finalni obim povećanja sa poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizirano svjetlo i diferencijalni interferentni contrast

2.1.2.2.7. Standardno laboratorijsko posuđe od stakla

- 2.1.2.2.8. Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska pločica, pločica sa udubljenjem, pokrovna pločica (20 × 20 mm), pinceta, fina kašika
2.1.2.2.9. Laboratorijska peć
2.1.2.2.10. Centrifuga

2.1.2.2.10. Filter papir: kvalitativni celulozni filter (veličine otvora 4–11 µm)

2.1.3. Uzimanje uzoraka i priprema uzorka

2.1.3.1. Uzimanje uzoraka

Koristi se reprezentativni uzorak uzet u skladu sa Prilogom 1.

2.1.3.1.1. Sušenje uzorka: uzorci sa sadržajem vlage > 14 % suše se prije rukovanja u skladu sa Prilogom 3.

2.1.3.1.2. Prethodno prosijavanje uzorka: kako bi se prikupile informacije o mogućem spoljnom zagađenju hrane za životinje, preporučuje se da se hrana u peletima i zrnu prethodno prosije na 1 mm i da se dvije dobijene frakcije, koje se moraju smatrati različitim uzorcima, zatim odvojeno pripreme i analiziraju i da se o njima odvojeno izvjesti.

2.1.3.2. Mjere opreza

Kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija u laboratoriji, svu laboratorijsku opremu za višekratnu upotrebu potrebno je pažljivo očistiti prije upotrebe. Djelove lijevka za odvajanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Djelove lijevka za odvajanje i posude od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u mašini za posude. Sita treba da se očiste četkom sa tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporučuje se završno čišćenje sita acetonom i vazduhom iz kompresora nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

2.1.3.3. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti i ulja

Potrebno je slijediti sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti i ulja:

- ako je mast u čvrstom stanju, zagrijava se u pećnici, dok ne postane tečna.
- koristeći pipetu prenese se 40 ml masti ili ulja sa dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje.
- centrifugira se 10 minuta na 4 000 obr/min.
- ako je mast u čvrstom stanju nakon centrifugiranja, zagrijava se u pećnici dok ne postane tečna.
- ponovo se centrifugira 5 min na 4 000 obr/min.
- malom kašikom ili špatulom se prenese polovina dekantovane nečistoće na mikroskopsku pločicu radi pregleda. Kao sredstvo za pripremu preparata preporučuje se glicerol.
- preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u tački 2.1.3.4.3)

2.1.3.4. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.4.1. Razdvajanje uzorka u poduzroke i mljevenje: barem 50 g uzorka se razdvoji na poduzorke za analizu koji se zatim melju

2.1.3.4.2. Priprema sirovine: priprema se dio od najmanje 5g samljevenog poduzorka. Prosijava se na 0,25mm i ispituju se obje dobijene frakcije.

2.1.3.4.3. Jednostruka sedimentacija TCE-om za detekciju sastojaka životinjskog porijekla osim kopnenih bezkičmenjaka.

- Ekstrakcija i priprema taloga:

prenese se dio od 10 g (sa preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odvajanje ili čašu sa konusnim dnom za taloženje i doda se 50 ml TCE-a. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3 g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog porijekla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10 % taloga. Mješavinu je potrebno snažno promućkati tokom najmanje 30 s i mora se oprezno dodati najmanje još 50 ml ako je mast u čvrstom stanju kako bi se isprali unutrašnji zidovi lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobijena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem slavine.

Ako se koristi čaša sa konusnim dnom za taloženje, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prijanjujuće čestice uz zidove čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu sa najmanje 10 ml čistog TCE-a. Mješavinu je potrebno ostaviti da stoji tokom 3 minuta i zatim ponovo promiješati tokom 15 sekundi, a sve čestice koje prijanjaju uz zidove čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu sa najmanje 10 ml čistog TCE-a. Tako dobijena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta, zatim se tečna frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se ni malo taloga ne izgubi.

Talog se prikuplja na filter papiru koji se stavlja u lijevak kako bi se omogućilo odvajanje preostalog trihloretilena (TCE) i pritom izbjeglo nakupljanje masti u talogu. Talog se zatim suši. Preporučuje se da se talog zatim izvaga (sa preciznošću od 0,001 g) u svrhu kontrole faze sedimentacija. Konačno, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim, talog se prosijava na 0,25 mm pa se dvije dobijene frakcije ispituju.

- Ekstrakcija i priprema flotata:

Nakon dobijanja taloga gore opisanim metodom, u lijevku za odvajanje moraju ostati dvije faze: tečna koja se sastoji od tetrahloretilena i čvrsta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta čvrsta faza je flotat koji se izoluje tako da se tetrahloretilen u cijelosti odlije iz lijevka otvaranjem slavine. Okretanjem lijevka za odvajanje, flotat se prenese u veliku Petrijevu šolju i suši na vazduhu u digestoru. Prosijava na 0,25 mm pa se dvije dobijene frakcije ispituju.

- Upotreba reagensa za bojenje

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog porijekla, subjekt može koristiti reagens za bojenje tokom pripreme uzorka u skladu sa smjernicama koje je izdao EURL-AP.

Ako se koristi rastvor Alizarin crveno za bojanje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

- osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere sa približno 5 ml etanola (svaki put se koristi miješalica (vortex) tokom 30 s, a rastvor se ostavi stajati približno 1 minut i 30 s i zatim odlije).
- talog se izbjele dodavanjem najmanje 1 ml rastvora natrijum hipohlorita. Reakcija se razvija 10 min. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi da stoji 2-3 min, a voda i suspendovane čestice se pažljivo odlije.
- talog se dva puta ispere sa 10 ml vode (koristi se miješalica (vortex) 30 s, ostavi se taložiti i svaki put se odlije voda).
- Doda se 2-10 kapi rastvora Alizarin crveno i smješa se promućka na mješalici. Trajanje reakcije je 3 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere sa približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki se put koristi miješalica 30 s, a rastvor se ostavi da stoji približno 1 minut i zatim odlije).
- obojeni talog se osuši

2.1.3.4.4. Dvostruka sedimentacija PE/TCE za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka.

Svi se koraci moraju sprovesti u konusnom staklenom lijevku za odlivanje zapremine 250 ml kako je opisano u tački 2.1.2.2.,

— Dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog uzorka prenese se u lijevak za odlivanje i najprije se podvrgava jednostruko sedimentaciji TCE-om kako je opisano u tački 2.1.3.4.3., uključujući dobijanje taloga na filter papiru postavljenom na lijevak. Taj se talog može upotrijebiti kao talog iz tačke 2.1.3.4.3.

— Mala zapremina TCE-a koji se iscijedi zajedno s talogom prenosi se u menzuru. Menzura se mora dodatno napuniti otvaranjem čepa lijevka za odlivanje dok se ne dobije 30 ml TCE-a. Kad se dobije ta zapremina, lijevak se začepe.

— Prikupljena zapremina TCE-a zamjenjuje se dodavanjem zapremine od 30 ml petroletera tačke vrenja 40–60 °C u lijevak za odlivanje. Sadržaj lijevka za odlivanje mora se dobro promiješati kako bi se dobila smjesa u odnosu 70 % TCE-a i 30 % PE-a (s gustinom od približno 1,26 g.cm-3). Materijal treba da odstoji 10 minuta. Odvojiti će se dvije nove frakcije: drugi talog i konačni flotat (< 1,26 g.cm-3). Drugi talog se izoluje u Petrijevoj posudi (ili na filter papiru postavljenom na lijevak) otvaranjem čepa dok u lijevku za odlivanje ne ostane samo malo smjese rastvarača i konačni flotat. Preostala tečnost i konačni flotat prikupljaju se odvojeno na filter papiru postavljenom na lijevak. Zid lijevka za odjeljivanje ispire se mlazom PE-a kako bi se sakupio sav materijal iz konačnog flotata. Konačni flotat se mora osušiti i prosijavati na 0,25 mm, a dvije dobijene frakcije ispituju se radi detekcije sastojaka kopnenih bezkičmenjaka, osim ako se prosijavanje smatra nepotrebnim.

2.1.4. Mikroskopski pregled

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat priprema se od taloga i, po izboru laboranta, od flotata ili sirovom materijalu. Prema potrebi, samo za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka, priprema se i preparat od konačnog flotata dobijenog kako je opisano u tački 2.1.3.4.4. Pripremaju se dvije dobijene frakcije (sitna i gruba). Pokusni dijelovi frakcija nanoseni na stakalca reprezentativni su za čitavu frakciju. Eksperimentalni dijelovi frakcija nanoseni na stakalca reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se obezbijilo sprovođenje čitavog ispitivanja u skladu sa tačkom 2.1.4.2. ovog dijela.

Mikroskopski preparati se pripremaju sa odgovarajućim sredstvom za pripremu preparata u skladu sa SOP-om koji je odredio EURL-AP. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim pločicama.

2.1.4.2. Dijagram toka pregleda za određivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i hranivima i premiksima.

Pripremljeni mikroskopski preparati pregledaju se u skladu s dijagramima toka pregleda propisanim u dijagramima 1. i 2.

Mikroskopski pregledi sprovode se koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i, po izboru laboranta, na flotatu ili na sirovom materijalu. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije.

Osim toga, za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka ispitivanja se rade i na konačnom flotatu dobijenom kako je opisano u tački 2.1.3.4.4. u skladu s dijagramom 3. Uz mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat pregleda se cijeli i pod različitim uvećanjima. Precizna objašnjenja o korišćenju dijagrama toka pregleda detaljno su navedena u SOP-u koji je utvrdila referentna laboratorija Evropske Unije za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP).

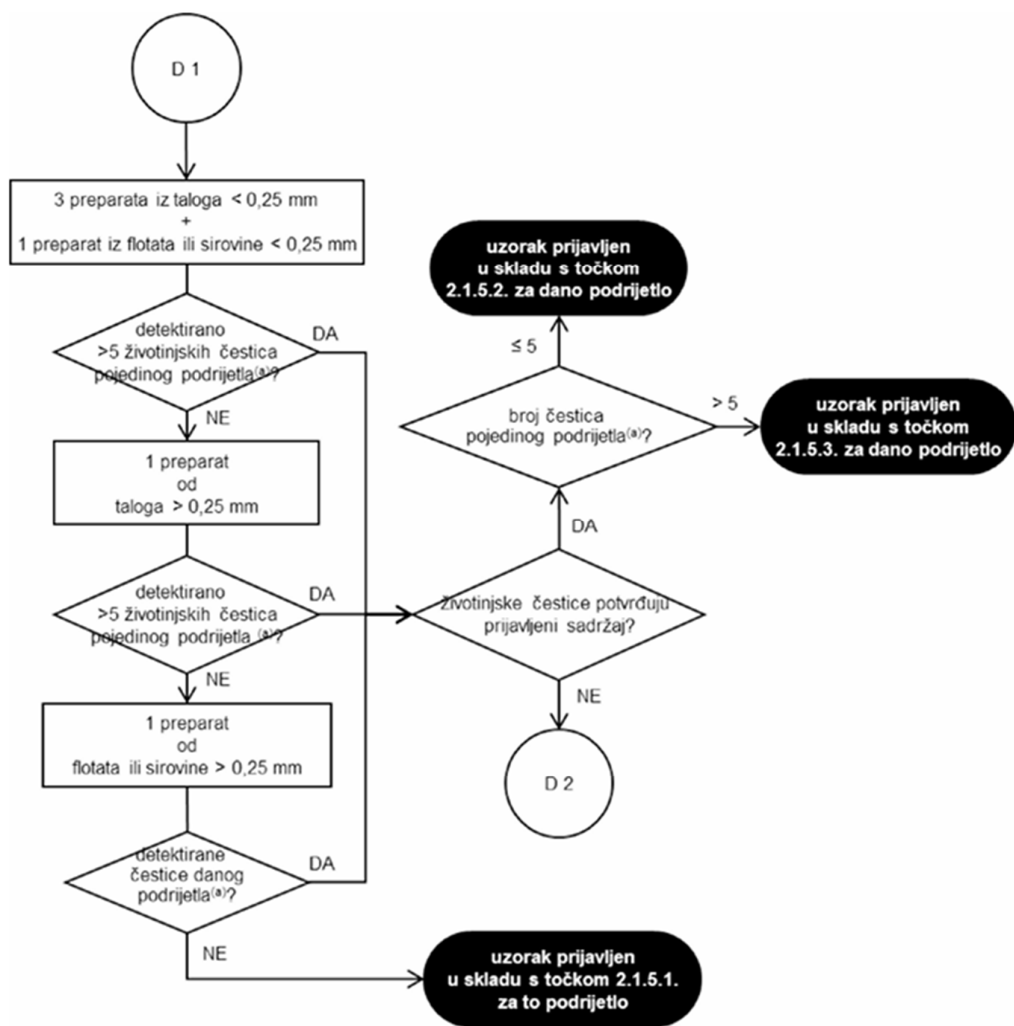
Najmanji broj preparata koji se mora posmatrati u svakoj fazi dijagrama toka pregleda mora se strogo poštovati, osim u slučajevima kada cijeli materijal frakcije ne omogućuje postizanje utvrđenog broja preparata (npr. u slučaju nedobijanja taloga). Pri svakom određivanju upotrebljava se najviše 6 preparata za određivanje broja čestica.

Ako se na flotatu ili sirovini pripremaju dodatni preparati primjenom posebnog sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja, kako je utvrđeno u tački 2.1.2.1.4. za potrebe daljeg utvrđivanja struktura (npr. perja, dlaka, mišića ili čestica krvi) otkrivenih na preparatima pripremljenim drugim sredstvom za pripremu preparata, kako je utvrđeno u tački 2.1.2.1.3. broj čestica računa se na osnovu broja preparata po određivanju koji nije veći od 6, uključujući dodatne preparate s posebnim sredstvom za pripremu preparata. Dodatni preparati pripremljeni od konačnog flotata dobijenog kako je opisano u tački 2.1.3.4.4. za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka ne uzimaju se u obzir za identifikaciju kopnenih kičmenjaka i riba.

Za lakšu identifikaciju vrste i porijekla čestica laborant može koristiti pomoćne alate kao što su sistemi za pomoć pri odlučivanju, slikovne knjižice i referentni uzorci.

Dijagram 1.

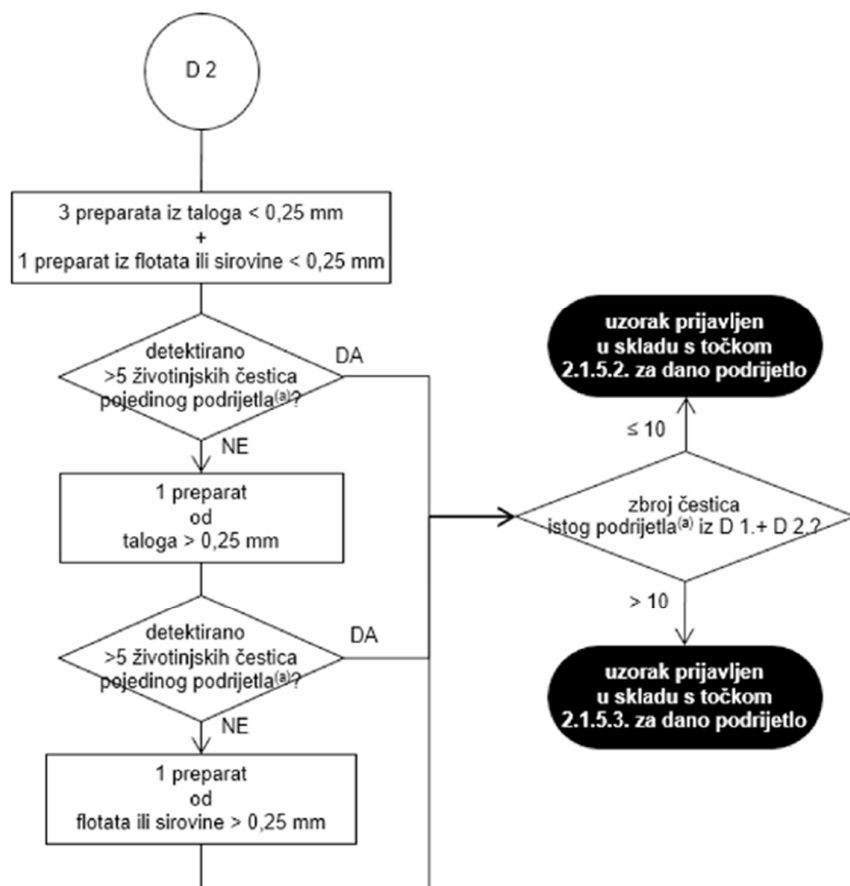
Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih bezkičmenjaka u krmnim smješama, hranivima i premiksima za prvo određivanje



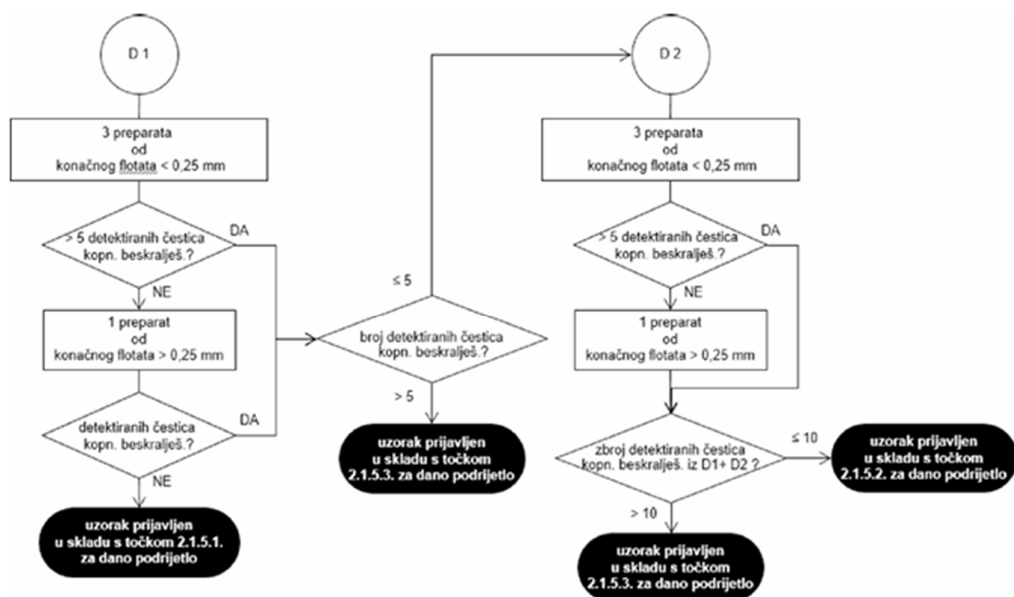
(D1 i D2 odnose se na prvo i drugo određivanje; (a) kopneni kičmenjaci i ribe)

Dijagram 2.

Dijagram toka pregleda nakon jednostruke sedimentacije TCE-om za detekciju životinjskih čestica osim čestica kopnenih bezkičmenjaka u krmnim smješama, hranivima i premiksima za drugo određivanje



Dijagram 3.
Dijagram toka pregleda nakon dvostruke sedimentacije PE/TCE-om za detekciju sastojaka kopnenih bezkičmenjaka u krmnoj smješi, hranivima i premiksima



(D₁ i D₂ odnose se na prvo i drugo određivanje)

2.1.4.3. Broj određivanja

Određivanja se sprovedu na različitim poduzorcima od po 50 g.

Ako se nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanog u dijagramima 1 i 3 ne otkriju životinjske čestice, nije potrebno sprovoditi dodatno određivanje, a o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.1.

Ako se nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanog u dijagramu 1, otkrije jedna ili više životinjskih čestica datog porijekla (tj. od kopnenih kičmenjaka ili ribe), a porijeklo pronađenih čestica potvrđuje prijavljeni sadržaj uzorka, nije potrebno sprovesti drugo određivanje. Ako je broj životinjskih čestica datog porijekla otkrivenih tokom tog prvog određivanja veći od 5, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti po životinjskom porijeklu korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.2. Ako se, nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanog u dijagramu 3, u tvrdi više od 5 čestica kopnenih kičmenjaka, nije potrebno drugo određivanje i rezultat analize za porijeklo čestica prijavljuje se u skladu sa terminologijom iz tačke 2.1.5.3.

U drugim slučajevima, ako laboratoriji nije dostavljena deklaracija sadržaja, sprovodi se drugo određivanje na osnovu novog poduzorka. Ako je, nakon drugog određivanja sprovedenog u skladu s dijagramom toka pregleda propisanim u dijagramima 2. odnosno 3. broj životinjskih čestica datog porijekla detektovanih u dva određivanja veći od 10, o rezultatima analize potrebno je prijaviti na osnovu porijekla životinje u skladu sa terminologijom iz tačke 2.1.5.3. Inače je o rezultatima analize potrebno izvijestiti po vrsti životinje u skladu sa terminologijom iz tačke 2.1.5.2.

2.1.5. Prikazivanje rezultata

Pri izveštavanju o rezultatima, laboratorija mora navesti na kojoj vrsti materijala je sprovedena analiza (talog, flotat ili sirovi materijal). U izveštaju se jasno navodi koliko je određivanja sprovedeno i je li prije pripreme preparata sprovedeno prosijavanje frakcija u skladu sa tačke 2.1.3.3.4., trećim stavom, prvom alinejom ili tačkom 2.1.3.4.4. trećom alinejom.

Laboratorijski izveštaj mora sadržati barem informacije o prisutnosti sastojaka porijeklom od kopnenih kičmenjaka ili ribe. O različitim slučajevima izveštava se na sljedeće načine.

2.1.5.1. Nije otkrivena nijedna čestica datog porijekla:

- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijeklom od kopnenih kičmenjaka.
- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijeklom od ribe.
- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijeklom od kopnenih bezkičmenjaka.

2.1.5.2. Pri sprovođenju samo jednog određivanja otkriveno je od 1 do 5 životinjskih čestica datog porijekla ili pri sprovođenju dvaju određivanja otkriveno je od 1 do 10 čestica datog porijekla (broj otkrivenih čestica manji je od praga utvrđenog u standardnim operativnim postupcima (SOP) koje je utvrdila referentna laboratorija EU-a za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP).

Ako je sprovedeno samo jedno određivanje:

- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku utvrđena je prisutnost najviše 5 čestica porijeklom od kopnenih kičmenjaka. Čestice su identifikovane kao kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo. Taj nizak nivo prisutnosti niži je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.
- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku detektovana je prisutnost najviše 5 čestica porijeklom od ribe. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblja kriljušt, hrskavica, mišić, otolith, škrge ostalo. Taj nizak nivo prisutnosti niži je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.

Ako su sprovedena dva određivanja:

- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku tokom dva određivanja utvrđena je prisutnost najviše 10 čestica porijeklom od kopnenih kičmenjaka. Čestice su identifikovane kao kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi ostalo (navesti odgovarajuće). Taj nizak nivo prisutnosti niži je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.
- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku tokom dva određivanja utvrđena je prisutnost najviše 10 čestica porijeklom od ribe. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblja kriljušt, hrskavica, mišić, otolith, škrge, ostalo. Taj nizak nivo prisutnosti niži je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.
- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku tokom dva određivanja utvrđena je prisutnost najviše 10 čestica porijeklom od kopnenih bezkičmenjaka. Čestice su identifikovane kao djelovi kutikule, djelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo. Taj nizak nivo prisutnosti niži je od praga utvrđenog za tu mikroskopsku metodu.

Osim toga:

- u slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izveštaju mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak zagađenja iz okolne sredine.
- ako se otkriju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizovati kao čestice porijeklom od kopnenih kičmenjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izveštaju se navodi da su otkrivene samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potiču od kopnenih kičmenjaka.

2.1.5.3. Pri sprovođenju samo jednog određivanja otkriveno je više od 5 životinjskih čestica datog porijekla ili je pri sprovođenju dvaju određivanja otkriveno više od 10 čestica datog porijekla:

Ako je sprovedeno samo jedno određivanje:

- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku utvrđena je prisutnost više od 5 čestica porijeklom od kopnenih kičmenjaka. Čestice su identifikovane kao kosti, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navesti odgovarajuće).
- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku utvrđena je prisutnost više od 5 čestica porijeklom od ribe. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblja kriljušt, hrskavica, mišić, otolith, škrge ostalo (navesti odgovarajuće).
- koliko je moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku utvrđena je prisutnost više od 5 čestica porijeklom od kopnenih bezkičmenjaka. Čestice su identifikovane kao djelovi kutikule, djelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture, ostalo (navesti odgovarajuće).

Ako su sprovedena dva određivanja:

- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektovano je prisustvo više od 10 čestica porijeklom od kopnenih kičmenjaka. Čestice su identifikovane kao kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi, ostalo (navesti odgovarajuće).
- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektovano je prisustvo više od 10 čestica porijeklom od ribe. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblja kriljušt, hrskavica, mišić, otolith, škrge i ostalo
- koliko je bilo moguće utvrditi pregledom svjetlosnim mikroskopom, u dva utvrđivanja u dostavljenom uzorku detektovano je prisustvo više od 10 čestica porijeklom od kopnenih bezkičmenjaka. Čestice su identifikovane kao djelovi kutikule, djelovi usne šupljine, mišići, trahealne strukture i ostalo

Osim toga:

- u slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izveštaju mora biti navedeno u kojoj su frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak zagađenja iz okolne sredine.
- ako se otkriju samo životinjske čestice koje se ne mogu kategorizovati kao čestice porijeklom od kopnenih kičmenjaka ili ribe (npr. mišićna vlakna), u izveštaju se navodi da su otkrivene samo takve životinjske čestice i da se ne može isključiti da potiču od kopnenih kičmenjaka.

2.2. PCR

2.2.1. Princip

Fragmenti dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) životinjskog porijekla koji mogu biti prisutni u hranivima i smješama za ishranu životinje otkrivaju se tehnikom genskog umnožavanja putem PCR-a koja cilja DNK sekvence značajne za vrstu.

PCR metoda zahtijeva najpre ekstrakciju DNK-a. Umnožavanje se vrši kasnije na dobijenom DNK ekstraktu kako bi se otkrila ciljana životinjska vrsta.

2.2.2. Reagensi i oprema

2.2.2.1. Reagensi

2.2.2.1.1. Reagensi za ekstrakciju DNK-a

Upotrebljavaju se samo reagensi koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.2.1.2. Reagensi za umnožavanje genskog materijala

2.2.2.1.2.1. "Primers" i sonde

Upotrebljavaju se samo primer i sonde sa sekvencama oligonukleotida koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.2.1.2.2. Glavna mješavina (Master mix)

Upotrebljavaju se samo rastvori glavne mješavine koje ne sadrže reagense koji bi mogli prouzrokovati lažne rezultate zbog prisutnosti životinjskog DNK-a.

2.2.2.1.2.3. Reagensi za dekontaminaciju. 2.2.2.1.2.3.1. Rastvor

hlorovodonične kiseline (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Izbjeljivač (rastvor natrijum hipohlorita s 0,15 % aktivnog hlora).

2.2.2.1.2.3.3. Ne korozivni reagensi za dekontaminaciju skupih uređaja kao što su analitičke vage (napr. DNA Erase™

proizvođača MP Biomedicals). 2.2.2.2. Oprema

2.2.2.2.1. Analitička vaga sa preciznošću od 0,001 g.

2.2.2.2.2. Pribor za mljevenje.

2.2.2.2.3. Uređaj za PCR (Thermocycler) koji omogućava PCR u stvarnom vremenu. 2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga za mikropruvete.

2.2.2.2.5. Komplet mikropipeta koje omogućavaju pipetiranje od 1 µl do 1 000 µl.

2.2.2.2.6. Standardna plastična oprema za mikrobiologiju: mikropruvete za mikrocentrifugu, plastični nastavci s filterima za mikropipete, odgovarajuće pločice za uređaj za PCR (thermocycler).

2.2.2.2.7. Frižideri za skladištenje uzoraka i reagensa

2.2.3. Uzimanje uzoraka i priprema uzorka 2.2.3.1. Uzimanje

uzoraka

Reprezentativni uzorak je uzorak uzet u skladu sa odredbama Priloga I ovog pravilnika.

2.2.3.2. Priprema uzorka

Pri pripremi laboratorijskih uzoraka do ekstrakcije DNK-a vrši se u skladu sa zahtjevima datim u Prilogu II ovog pravilnika. Od najmanje 50 g uzorka se napravi poduzorak za analizu, koji se zatim samelje.

Priprema uzorka mora se sprovesti u drugom prostoru od onih koji se koriste za ekstrakciju DNK-a i umnožavanje genskog materijala u skladu sa standardom ISO 24276.

Pripreme se dva tesna uzorka od najmanje 100 mg svaki.

2.2.4. Ekstrakcija DNK-a

Ekstrakcija DNK-a sprovodi se na svakom pripremljenom testnom uzorku koristeći SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

Za svaku seriju ekstrakcije DNK-a pripremaju se dva kontrolna uzorka kako je opisano u ISO standardu 24276:

- slijepi kontrolni uzorak ekstrakcije;
- pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a.

2.2.5. Umnožavanje genskog materijala

Genski material se umnožava koristeći metode odobrene za svaku vrstu koja zahtjeva identifikaciju. Te metode su propisane u SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici. Svaki ekstrakt DNK-a se analizira u najmanje dva različita razblaženja kako bi se ocijenila inhibicija.

Za svaku ciljanu vrstu pripremaju se dva kontrolna uzorka koja se umnožavaju kako je opisano u ISO standard 24276.

- pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.
- Kontrolni uzorak reagensa za umnožavanje (zove se takođe kontrolni uzorak bez matrice) se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.

2.2.6. Tumačenje i prikaz rezultata

U izvještaju o rezultatima laboratorija mora se navesti najmanje masu upotrijebljenog testnog uzorka, korišćene tehnike za ekstrakciju, broj sprovedenih određivanja i granicu detekcije metode.

Rezultati se ne smiju tumačiti i saopštavati ako pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a i pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om ne omogućavaju određivanje ciljane vrste pri analizi, dok je rezultat kontrolnog uzorka reagensa za umnožavanje negativan.

U slučaju da rezultati dva testna uzorka nisu u skladu, potrebno je ponoviti barem korak genskog umnožavanja. Ako laboratorija sumnja da razlog za neusklađenost mogu biti ekstrakti DNK-a, sprovodi se nova ekstrakcija DNK-a i umnožavanje genskog materijala prije tumačenja rezultata.

Konačni prikaz rezultata mora se zasnivati na integraciji i tumačenju rezultata dva testna uzorka u skladu sa SOP-om koji je uspostavio EURL-AP.

2.2.6.1. Negativni rezultat

O negativnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

U dostavljenom uzorku nije bio otkriven ni jedan DNK iz X (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

2.2.6.2. Pozitivni rezultat

O pozitivnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

DNK iz X je otkriven u dostavljenom uzorku (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

METODA ZA ODREĐIVANJE ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANE ZA ŽIVINU**1. Metoda izračunavanja i prikaza energetske vrijednosti**

Energetska vrijednost hrane za živinu izražava se u procentima sastojaka hrane za životinje. Energetska vrijednost iskazuje se u megadžulima (MJ) metaboličke energije (ME), sa korekcijama za azot, na kilogram smješe:

$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ sirovih proteina} + 0,3431 \times \% \text{ sirovih masti} + 0,1669 \times \% \text{ skroba} + 0,1301 \times \% \text{ ukupnog šećera (iskazanog kao saharoza)}$.

2. Odstupanja za vrijednosti

Ako se službenom kontrolom otkrije razlika (povećana ili smanjena energetska vrijednost hrane za životinje) između rezultata pregleda i energetske vrijednosti koja je navedena na etiketi ili oznaci koja prati hranu za životinje, dozvoljeno je najmanje odstupanje od 0,4 MJ/kg ME.

3. Prikaz rezultata

Rezultat ispitivanja energetske vrijednosti primjenom formule iz tačke 1 ovog priloga iskazuju se jednom decimalom.

4. Metode uzimanja uzoraka i metode analize

Uzimanje uzoraka krmnih smješa i određivanje udjela analitičkih sastojaka navedenih u metodi izračunavanja vrši se u skladu sa propisanim metodama:

- za određivanje udjela sirove masti: postupak B metode za određivanje sirovih ulja i masti iz dijela 5 Priloga III ovog pravilnika,
- za određivanje udjela skroba: polarimetrijska metoda iz dijela 8 Priloga III ovog pravilnika.

IZRAČUNAVANJE ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANIVA I KRMNIH SMJEŠA ZA MAČKE I PSE

Energetska vrijednost hraniva i krmnih smješa za mačke i pse izračunava se u skladu sa standardom EN 16967 Hrana za životinje - Metode uzimanja uzoraka i analize - Jednačine za predviđanje metaboličke energije u hranivima i smješama hrane za životinje (kućne ljubimce) za mačke i pse, uključujući i dijetetsku hranu