

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

3699

Na temelju članka 65. alineje 8. Zakona o hrani (»Narodne novine«, broj 46/07) ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O METODAMA UZORKOVANJA I ANALITIČKIM METODAMA ZA PROVEDBU SLUŽBENIH KONTROLA HRANE ZA ŽIVOTINJE [\[1\]](#)

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuju metode uzorkovanja i analitičke metode za provedbu službenih kontrola hrane za životinje.

Članak 2.

Uzorkovanje za službenu kontrolu hrane za životinje u vezi s određivanjem sastojaka, dodataka hrani za životinje i nepoželjnih tvari, osim ostataka pesticida i mikroorganizama provodi se sukladno metodama iz Priloga I. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

Priprema uzoraka za analizu i prikaz rezultata provode se sukladno analitičkim metodama iz Priloga II. ovoga Pravilnika.

Članak 4.

Analiza za službenu kontrolu hrane za životinje provodi se metodama navedenim u:

- Prilogu III. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu sastava krmiva i krmnih smjesa,
- Prilogu IV. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu količine odobrenih dodataka hrani za životinje,
- Prilogu V. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu nepoželjnih tvari u hrani za životinje i
- Prilogu VI. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla za službenu kontrolu hrane za životinje.

Članak 5.

Energetska vrijednost krmnih smjesa za perad izračunava se sukladno Prilogu VII. ovoga Pravilnika.

Članak 6.

U svrhu potvrđivanja prisutnosti nedopuštenih dodataka hrani za životinje koriste se analitičke metode za kontrolu iz Priloga VIII. ovoga Pravilnika.

Članak 7.

Prilozi od I. do VIII. tiskani su uz ovaj Pravilnik i njegov su sastavni dio.

Članak 8.

Stupanjem na snagu ovoga Pravilnika prestaje važiti Prilog VII. Pravilnika o stavljanju na tržište krmiva i krmnih smjesa (»Narodne novine«, broj 112/08) i Pravilnik o načinu uzorkovanja hrane za životinje (»Narodne novine«, broj 128/06).

Članak 9.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu 1. siječnja 2011. godine.

Klasa:
Urbroj:
Zagreb, 13. prosinca 2010.

011-02/10-01/74
525-06-2-0261/10-14

Ministar
Petar
Čobanković, v. r.

PRILOG I. – PRILOG VIII.

[1] Ovim se Pravilnikom preuzimaju odredbe Uredbe Komisije (EZ) br. 152/2009 od 27. siječnja 2009. godine o metodama uzimanja uzoraka i analitičkim metodama za provedbu službenih kontrola hrane za životinje.

2. OSOBE ZA UZIMANJE UZORAKA

Uzorke uzimaju osobe koje za tu svrhu ovlašćuje nadležno tijelo.

3. POJMOVNIK

Uzorkovani dio: količina proizvoda koja predstavlja cjelinu i ima osobine koje se smatraju jednolikim.

Pojedinačni uzorak: količina koja se uzima iz jedne točke uzorkovanog dijela.

Skupni uzorak: skup pojedinačnih uzoraka uzetih iz istog uzorkovanog dijela.

Reducirani uzorak: reprezentativni dio skupnog uzorka dobiven postupkom smanjivanja skupnog uzorka.

Konačni uzorak: dio reduciranog uzorka ili homogeniziranog skupnog uzorka.

4. OPREMA

4.1. Oprema za uzorkovanje mora biti izrađena iz materijala koji ne mogu kontaminirati proizvode namijenjene uzorkovanju.

4.2. Preporučena oprema za uzorkovanje krute hrane za životinje

4.2.1. Ručno uzorkovanje

4.2.1.1. Lopatica s ravnim dnom i okomitim stranicama.

4.2.1.2. Sonda za uzorkovanje s dugim procjepom ili pregradama.

Dimenzije sonde za uzorkovanje moraju odgovarati osobinama uzorkovanog dijela (dubina posude, veličina vreće itd.) i veličini čestica hrane za životinje.

4.2.2. Mehaničko uzorkovanje

Za uzorkovanje hrane za životinje koja se kreće tijekom proizvodnje i skladištenja može se koristiti prikladna mehanička oprema.

4.2.3. Razdjelnik

Naprava namijenjena za dijeljenje uzorka na približno jednake dijelove može se koristiti za uzimanje pojedinačnih uzoraka i za pripremu reduciranih i konačnih uzoraka.

5. KOLIČINSKI ZAHTJEVI

5.A Pri kontroli tvari ili proizvoda koji su ravnomjerno raspodijeljeni u hrani za životinje

5.A.1. Uzorkovani dio

Količina uzorkovanog dijela mora biti dovoljna da se od svakog njegovog sastavnog dijela može načiniti uzorak

5.A.2. Pojedinačni uzorci

5.A.2.1. Hrana za životinje

u rasutom stanju:

Najmanji broj pojedinačnih uzoraka:

5.A.2.1.1. uzorkovani dijelovi

manji od 2,5 tone

sedam

5.A.2.1.2. uzorkovani dijelovi

veći od 2,5 tone

Kvadratni korijen iz dvadeseterokratnika

broja tona u uzorkovanom

dijelu*, do najviše 40

pojedinačnih uzoraka

5.A.2.2. Pakirana hrana za

životinje:

Najmanji broj pakovina za uzorkovanje**:

5.A.2.2.1. Pakovine mase

veće od 1 kg:

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom propisuju metode uzorkovanja i analitičke metode za provedbu službenih kontrola hrane za životinje.

Članak 2.

Uzorkovanje za službenu kontrolu hrane za životinje u vezi s određivanjem sastojaka, dodataka hrani za životinje i nepoželjnih tvari, osim ostataka pesticida i mikroorganizama provodi se sukladno metodama iz Priloga I. ovoga Pravilnika.

Članak 3.

Priprema uzoraka za analizu i prikaz rezultata provode se sukladno analitičkim metodama iz Priloga II. ovoga Pravilnika.

Članak 4.

Analiza za službenu kontrolu hrane za životinje provodi se metodama navedenim u:

- Prilogu III. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu sastava krmiva i krmnih smjesa,
- Prilogu IV. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu količine odobrenih dodataka hrani za životinje,
- Prilogu V. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za kontrolu nepoželjnih tvari u hrani za životinje i
- Prilogu VI. ovoga Pravilnika – Analitičke metode za određivanje sastojaka životinjskog podrijetla za službenu kontrolu hrane za životinje.

Članak 5.

Energetska vrijednost krmnih smjesa za perad izračunava se sukladno Prilogu VII. ovoga Pravilnika.

Članak 6.

U svrhu potvrđivanja prisutnosti nedopuštenih dodataka hrani za životinje koriste se analitičke metode za kontrolu iz Priloga VIII. ovoga Pravilnika.

Članak 7.

Prilozi od I. do VIII. tiskani su uz ovaj Pravilnik i njegov su sastavni dio.

Članak 8.

Stupanjem na snagu ovoga Pravilnika prestaje važiti Prilog VII. Pravilnika o stavljanju na tržište krmiva i krmnih smjesa (» Narodne novine«, broj 112/08) i Pravilnik o načinu uzorkovanja hrane za životinje (» Narodne novine«, broj 128/06).

Članak 9.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu 1. siječnja 2011. godine.

Klasa: 011-02/10-01/74

Urbroj: 525-06-2-0261/10-14

Zagreb, 13. prosinca 2010.

Ministar

Petar Čobanković, v. r.

PRILOG I.

METODE UZIMANJA UZORAKA

1. SVRHA I OPSEG PRIMJENE

Uzorci za službenu kontrolu hrane za životinje uzimaju se sukladno dolje opisanim metodama. Tako dobiveni uzorci smatraju se reprezentativnim.

STRANICA 4 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

**NARODNE
NOVINE** SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

5.A.3.4.2. pojedinačne mase

do 1 kg

masa četiri izvorna bloka ili kamena

za lizanje

5.A.4. Konačni uzorci

Iz skupnog se uzorka po potrebi nakon smanjivanja dobiva konačni uzorak. Potrebna je analiza najmanje jednog konačnog uzorka. Količina konačnog uzorka za analizu ne smije biti manja od:

Kruta hrana za

životinje

500 g

Tekuća ili polutekuća

hrana za

životinje

500 mL

5.B Pri kontroli nepoželjnih tvari ili proizvoda, vjerojatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, poput afl atoksina, ražene glavice, ricinusa i krotalarije u krmivima.***

5.B.1. **Uzorkovani dio:** vidi točku 5.A.1. ovoga Priloga

5.B.2. **Pojedinačni uzorci**

5.B.2.1. Hrana za životinje u rasutom stanju: vidi točku

5.A.2.1. ovoga Priloga

5.B.2.2. Pakirana hrana za

životinje:

Najmanji broj pakovina za uzorkovanje:

5.B.2.2.1. uzorkovani dijelovi

koji se sastoje od 1

do 4 pakovine

sve pakovine

5.B.2.2.2. uzorkovani dijelovi

koji se sastoje od 5

do 16 pakovina

četiri

5.B.2.2.3. uzorkovani dijelovi

s više od 16 pakovina

Kvadratni korijen iz broja pakovina

koje čine uzorkovani dio*,

do najviše 40 pakovina

5.B.3. **Skupni uzorci**

Broj skupnih uzoraka ovisi o veličini uzorkovanog

dijela. Najmanji broj skupnih uzoraka po uzorkovanom

dijelu niže je naveden. Ukupna masa pojedinačnih

uzoraka koji čine svaki skupni uzorak ne

smije biti manja od 4 kg.

5.B.3.1. Hrana za životinje

u rasutom stanju

Masa uzorkovanog

dijela u tonama:

Najmanji broj skupnih uzoraka
po uzorkovanom dijelu:

do ukupno 1 1

više od 1 do ukupno

10

2

više od 10 do

ukupno 40

3

više od 40 4

5.B.3.2. Pakirana hrana za

životinje

Broj pakovina

uzorkovanog

dijela:

Najmanji broj skupnih uzoraka

po uzorkovanom dijelu:

1 do 16 1

17 do 200 2

201 do 800 3

više od 800 4

5.A.2.2.1.1. uzorkovani dijelovi

od 1 do 4 pakovine

sve pakovine

5.A.2.2.1.2. uzorkovani dijelovi

od 5 do 16 pakovina

četiri

5.A.2.2.1.3. uzorkovani dijelovi

s više od 16 pakovina

Kvadratni korijen iz broja pakovina

koji čine uzorkovani dio*,

do najviše 20 pakovina

5.A.2.2.2. Pakovine mase do

1 kg

četiri

5.A.2.3. Tekuća ili polutekuća

hrana za

životinje:

Najmanji broj spremnika za

uzorkovanje**:

5.A.2.3.1. Spremnici zapremine

veće od 1 L:

5.A.2.3.1.1. uzorkovani dijelovi

od 1 do 4 spremnika

Svi spremnici

5.A.2.3.1.2. uzorkovani dijelovi

od 5 do 16 spremnika

četiri

5.A.2.3.1.3. uzorkovani dijelovi

s više od 16 spremnika

Kvadratni korijen iz broja spremnika

koje čine uzorkovani

dio*, do najviše 20 spremnika

5.A.2.3.2. Spremnici zapremine

do 1 L

četiri

5.A.2.4. Krmni blokovi ili

kameni za lizanje

Najmanji broj blokova ili kamena

za lizanje namijenjenih uzorkovanju**:

jedan blok ili kamen za lizanje

na uzorkovani dio od 25 komada,

do najviše četiri bloka ili kamena

za lizanje

5.A.3. Skupni uzorak:

Potrebno je pripremiti samo jedan skupni uzorak po uzorkovanom dijelu. Ukupan broj pojedinačnih uzoraka

koji čine skupni uzorak ne smije biti manji od:

5.A.3.1. Hrana za životinje

u rasutom stanju

4 kg

5.A.3.2. Pakirana hrana za

životinje:

5.A.3.2.1. pakovine mase

veće od 1 kg

4 kg

5.A.3.2.2. pakovine mase do

1 kg

masa sadržaja četiri izvorne pakovine

5.A.3.3. Tekuća ili polutekuća

hrana za

životinje:

5.A.3.3.1. Spremnici zapremine

veće od 1 L

4 L

5.A.3.3.2. Spremnici zapremine

do 1 L

zapremina četiri izvorna spremnika

5.A.3.4. Krmni blokovi ili

kameni za lizanje:

5.A.3.4.1. pojedinačne mase

veće od 1 kg

4 kg

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 5

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

6.2.A.5. *Krmni blokovi ili kameni za lizanje*

Nakon određivanja traženog broja blokova ili kamena za lizanje namijenjenih uzorkovanju iz točke 5.A.2. ovoga Priloga uzme se dio svakog bloka ili kamena za lizanje.

6.2.B *Pri kontroli nepoželjnih tvari ili proizvoda, vjerojatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, poput afl atoksina, ražene glavice, ricinusa i krotalarije u krmivima*

Uzorkovani dio se razdjeli na približno jednake dijelove koji odgovaraju broju ukupnih uzoraka iz točke 5.B.3. ovoga Priloga. Ako je taj broj veći od jedan, ukupan broj pojedinačnih uzoraka iz točke 5.B.2. ovoga Priloga razdjeli se približno ravnomjerno po različitim dijelovima. Zatim se uzmu uzorci približno jednake količine², koji moraju biti takvi da ukupna količina u uzorcima iz svakog dijela nije manja od 4 kg, što predstavlja minimalnu količinu za svaki skupni uzorak. Pojedinačni uzorci uzeti iz različitih dijelova ne smiju se spajati u skupni uzorak.

6.3. Priprema skupnih uzoraka

6.3.A *Pri kontroli tvari ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje*

Pojedinačni uzorci se pomiješaju tako da tvore skupni uzorak.

6.3.B *Pri kontroli nepoželjnih tvari ili proizvoda, vjerojatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, poput afl atoksina, ražene glavice, ricinusa i krotalarije u krmivima*

Pojedinačni uzorci iz svakog uzorkovanog dijela se pomiješaju i pripremi se broj skupnih uzoraka utvrđen točkom 5.B.3. ovoga Priloga, pri čemu treba zabilježiti izvor svakog skupnog uzorka.

6.4. Priprema konačnih uzoraka

Sadržaj svakog skupnog uzorka treba pažljivo izmiješati kako bi se dobio homogenizirani uzorak². Po potrebi se skupni uzorak najprije smanji na najmanje 2 kg ili 2 L (reducirani uzorak) mehaničkim ili automatskim razdjelnikom ili četvrtanjem.

Pripremi se najmanje tri konačna/testna uzorka približno jednake količine sukladno količinskim zahtjevima iz točke 5.A.4. ili

5.B.4. ovoga Priloga. Svaki se uzorak stavi u prikladni spremnik.

Potrebno je poduzeti sve mjere opreza da se spriječi promjena sastava uzorka, kontaminacija ili onečišćenje uslijed prijevoza ili skladištenja.

6.5. Pakiranje konačnih uzoraka

Spremnici ili pakovine moraju biti zapečaćeni i označeni na način da ih nije moguće otvoriti bez oštećenja pečata.

7. PODACI O UZORKOVANJU

O svim obavljenim uzorkovanjima moraju se voditi evidencije kako bi se svaki uzorkovani dio mogao nedvojbeno prepoznati.

8. DOSTAVLJANJE UZORAKA

Za svaki skupni uzorak treba najmanje jedan konačni uzorak odmah dostaviti u ovlašteni laboratorij sa svim podacima koji su potrebni za analizu uzorka.

² Kod pakirane hrane za životinje, sondom ili lopaticom se uzme dio sadržaja pakovine koji se uzorkuje, po potrebi, nakon odvojenog pražnjenja pakovine.

³ U svakom skupnom uzorku zasebno razbiju se sve grude, po potrebi tako što se odvoje i zatim vrate u uzorak.

5.B.4. Konačni uzorci

Iz svakog se skupnog uzorka nakon smanjivanja dobiva konačni uzorak. Potrebno je napraviti analizu najmanje jednog konačnog uzorka po skupnom uzorku. Masa konačnog uzorka za analizu ne smije biti manja od 500 g.

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

(**) Za pakovine ili spremnike sadržaja manjeg od 1 kg ili 1 L, te za blokove ili kamene za lizanje pojedinačne mase ne veće od 1 kg, pojedinačni uzorak čini sadržaj pojedinačne izvorne pakovine ili spremnika, jedan blok ili jedan kamen.

(***) Metode iz točke 5.A ovoga Priloga koriste se za kontrolu afl atoksina, ražene glavice, ricinusa i krotalarije u potpunim i dopunskim krmnim smjesama.

6. UPUTE ZA UZIMANJE, PRIPREMANJE I PAKIRANJE

UZORAKA

6.1. Općenito

Uzorci se moraju uzimati i pripremiti u što kraćem vremenu uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprječavaju promjene ili kontaminacija proizvoda. Instrumenti, radne površine i spremnici za prihvatanje uzoraka moraju biti čisti i suhi.

6.2. Pojedinačni uzorci

6.2.A Pri kontroli tvari ili proizvoda koji su ravnomjerno raspodijeljeni u hrani za životinje

Pojedinačni uzorci moraju se uzeti nasumično iz cijeloga uzorkovanog dijela i moraju biti približno jednake količine.

6.2.A.1. Hrana za životinje u rasutom stanju

Uzorkovani se dio dijeli na približno jednake zamišljene dijelove.

Nasumično se odabere broj dijelova koji odgovara traženom broju pojedinačnih uzoraka sukladno točki 5.A.2. ovoga Priloga i iz svakog od njih se uzme najmanje jedan uzorak.

Po potrebi se uzorkovanje može izvršiti kod premještanja uzorkovanog dijela (pri utovaru ili istovaru).

6.2.A.2. Pakirana hrana za životinje

Nakon određivanja potrebnog broja pakovina za uzorkovanje sukladno točki 5.A.2. ovoga Priloga, sondom ili lopaticom se uzima dio sadržaja svake pakovine. Po potrebi, uzorci se mogu uzeti nakon odvojenog pražnjenja pakovina. U svakom skupnom uzorku zasebno razbiju se sve grude, po potrebi se odvoje i zatim vrate u uzorak.

6.2.A.3. Homogenizirana ili za homogeniziranje prikladna tekuća ili polutekuća hrana za životinje

Nakon određivanja potrebnog broja spremnika za uzorkovanje iz točke 5.A.2. ovoga Priloga, njihov se sadržaj po potrebi homogenizira i iz svakog se spremnika uzima određena količina.

Pojedinačni se uzorci mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja spremnika.

6.2.A.4. Tekuća ili polutekuća hrana za životinje koja nije prikladna za homogeniziranje

Nakon određivanja traženog broja spremnika za uzimanje uzoraka iz točke 5.A.2. ovoga Priloga, uzorci se uzimaju s različitih razina.

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

U oba slučaja ukupna zapremina ne smije biti manja od 10 L.

3.3. Tekuća ili polutekuća hrana za životinje

Uzorak se prikupi u prikladno čist i suh spremnik s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu uzorak se temeljito promiješa.

3.4. Ostala hrana za životinje

Uzorci koji se ne mogu pripremiti sukladno jednom od gore navedenih postupaka obrađuju se bilo kojim drugim postupkom kojim se osigurava da su količine uzoraka odvagane za analizu homogene i reprezentativne za konačne uzorke.

4. Pohrana uzoraka

Uzorci se moraju pohraniti na temperaturi koja neće promijeniti njihov sastav. Uzorci za analizu vitamina ili tvari osobito osjetljivih na svjetlo moraju se pohraniti u spremnicima od smeđeg stakla.

Dio B.

ODREDBE O REAGENSIMA I OPREMI KOJA SE KORISTI U ANALITIČKIM METODAMA

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

Dio C.

PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA

1. Postupak ekstrakcije

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

2. Postupak pročišćavanja

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

3. Izvještavanje o korištenoj analitičkoj metodi

Općenito je za određivanje svake tvari u hrani za životinje određena samo jedna analitička metoda. Kada postoji više metoda, laboratorij u analitičkom izvješću mora navesti korištenu metodu.

4. Broj određivanja

Rezultat naveden u analitičkom izvješću je srednja vrijednost najmanje dva određivanja zadovoljavajuće ponovljivosti izvedenih na odvojenim dijelovima uzorka.

PRILOG II.

OPĆE ODREDBE O ANALITIČKIM METODAMA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE

Dio A.

PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

1. Svrha

U dolje navedenim postupcima opisuje se priprema za analizu konačnih uzoraka koji se šalju laboratorijima nakon izvršenog uzorkovanja sukladno odredbama Priloga I. ovoga Pravilnika.

Uzorci se moraju pripremiti na način da izvagane količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke, kako je predviđeno za analitičke metode.

2. Mjere opreza

Postupak za pripremanje uzoraka ovisi o analitičkoj metodi koja se koristi. Zbog toga je vrlo važno osigurati primjerenost postupka za pripremanje uzorka analitičkoj metodi koja se koristi.

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

Mljevenje, miješanje i prosijavanje vrši se na najbrži mogući

način kako bi se uzorak čim manje izlagao zraku i svjetlu. Ne smiju se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak. Preporuča se ručno mljevenje za hranu za životinje koja je osobito osjetljiva na toplinu. Potrebno je osigurati da sama oprema ne bude izvor kontaminacija elementima u tragovima.

Ako nije moguće izvršiti pripremu bez znatne promjene udjela vode u uzorku, određuje se udio vode prije i nakon pripreme sukladno metodi utvrđenoj u Dijelu A Priloga III. ovoga Pravilnika.

3. Postupak

Uzorak se prikladnim tehnikama dijeljenja, poput naizmjeničnog uzimanja uzorka lopaticom ili uzimanja uzorka pri stacionarnom ili rotacijskom miješanju, razdjeli na prikladne poduzorke za analizu i za referentne namjene. Ne preporuča se dijeljenje uzoraka metodom stožaste hrpe i četvrtanja budući da se na taj način mogu dobiti poduzorci s visokom pogreškom dijeljenja. Referentni se uzorak drži u primjereno čistom i suhom spremniku s hermetičkim zatvaračem, a poduzorci mase ne manje od 100 g pripremaju se za analizu kako je niže navedeno.

3.1. Hrana za životinje koja se može samljati bez dodatne obrade

Ako se u analitičkim metodama ne navodi drugačije, po potrebi se cijeli uzorak nakon usitnjavanja prosije kroz sito s kvadratnim očicama veličine stranice 1 mm (sukladno preporuci HRN ISO 565:2008). Treba izbjegavati pretjerano mljevenje.

Prosijani se uzorak promiješa i prikupi u prikladno čist i suh spremnik s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu, uzorak se ponovo promiješa.

3.2. Hrana za životinje koja se može samljati nakon sušenja

Ako se u analitičkim metodama ne navodi drugačije, uzorak se, sukladno postupku za prethodno sušenje iz točke 4.3. metode za određivanje udjela vode iz Dijela A Priloga III. ovoga Pravilnika, suši onoliko vremena koliko je potrebno da se udio vode snizi na 8 – 12%. Zatim se nastavlja sukladno točki 3.1. ovoga Dijela.

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 7 **NARODNE**

NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

PRILOG III.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU SASTAVA

KRMIVA I KRMNIH SMJESA

Dio A.

ODREĐIVANJE VODE

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje udjela vode u hrani za životinje. Kada hrana za životinje sadrži hlapljive tvari, poput organskih kiselina, treba uzeti u obzir da se pri određivanju udjela vode utvrdi i znatna količina hlapljivih tvari.

Ova metoda ne obuhvaća analizu mliječnih proizvoda koji se koriste kao krmiva, analizu mineralnih tvari i mješavina sastavljenih uglavnom od mineralnih tvari, analizu životinjskih i biljnih masti i ulja ili analizu sjemenki uljarica i plodova uljarica.

2. Načelo

Uzorak se osuši pod određenim uvjetima koji su različiti ovisno o vrsti hrane za životinje. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem.

Kod krute hrane za životinje s visokim udjelom vode treba izvršiti prethodno sušenje.

3. Oprema

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

3.2. Analitička vaga s preciznošću do 1 mg

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

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

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

3.6. Eksikator s debelom metalnom ili porculanskom perforiranom pločom koja sadrži učinkovito sredstvo za isušivanje.

4. Postupak

Napomena. Postupci opisani u ovom odjeljku moraju se provesti odmah po otvaranju pakovina s uzorcima. Analiza se mora provesti najmanje dvaput za redom.

4.1. Priprema

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

ovoga Dijela

Uzme se najmanje 50 g uzorka. Po potrebi se usitni ili razdjeli tako da se spriječi promjena udjela vode (vidi točku 6. ovoga Dijela).

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

Kod analize nepoželjnih tvari, ako je rezultat prvog određivanja znatno (> 50%) niži od specifi kacije koja se kontrolira, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete.

Pri kontroli označenog sadržaja tvari ili sastojka, ako rezultat prvog određivanja potvrdi označeni sadržaj, tj. rezultat analize je unutar prihvatljivih granica odstupanja za označeni sadržaj, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete.

U nekim slučajevima ta prihvatljiva granica odstupanja utvrđena je propisima kao što je Pravilnik o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje (» Narodne novine«, broj 156/09)⁴.

5. Izvještavanje o rezultatima analize

Rezultat analize prikazuje se na način utvrđen analitičkom metodom s primjerenim brojem značajnih znamenki i mora se, po potrebi, korigirati s obzirom na udio vode u konačnom uzorku prije priprave.

6. Mjerna nesigurnost i stupanj iskorištenja pri analizi nepoželjnih tvari

U vezi s nepoželjnim tvarima u smislu Pravilnika o nepoželjnim tvarima (» Narodne novine«, broj 80/10)⁵, uključujući dioksine i PCB-e slične dioksinu, proizvod namijenjen za hranu za životinje smatra se nesukladnim u odnosu na određenu najveću dopuštenu količinu, ako je rezultat analize veći od najveće dopuštene količine uzimajući u obzir proširenu mjernu nesigurnost i korekciju za iskorištenje (engl. *recovery*). Za ocjenu usklađenosti koristi se analizirana koncentracija nakon korekcije za iskorištenje od koje se oduzima proširena mjerna nesigurnost. Ovaj se postupak primjenjuje samo u slučajevima kada analitička metoda omogućava procjenu mjerne nesigurnosti i korekcije za iskorištenje (na primjer, nije moguća u

slučaju mikroskopske analize).

Rezultati analize iskazuju se na sljedeći način (ako korištena analitička metoda omogućava procjenu mjerne nesigurnosti i stupnja iskorištenja):

(a) s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi razina iskorištenja. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je stupanj iskorištenja između 90% i 110%;

(b) kao $\gg x \pm U \ll$, pri čemu je x rezultat analize, a U proširena mjerna nesigurnost uz uporabu obuhvatnog faktora 2, čime se postiže razina pouzdanosti od približno 95%.

Ako je rezultat analize znatno ($> 50\%$) niži od specifikacije koja se kontrolira i pod uvjetom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvalitete, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa propisanim odredbama, rezultat analize može se iskazati bez korekcije za iskorištenje, i u tim se slučajevima stupanj iskorištenja i mjerna nesigurnost mogu izostaviti.

⁴ Pravilnikom su preuzete odredbe Uredbe (EZ) br. 767/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 13. srpnja 2009. godine o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje, izmjenama i dopunama Uredbe (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća i ukidanju Direktive Vijeća 79/373/EEZ, Direktive Komisije 80/511/EEZ, Direktive Vijeća 82/471/EEZ, 83/228/EEZ, 93/74/EEZ, 93/113/EZ i 96/25/EZ te Odluke Komisije 2004/217/EZ.

⁵ Pravilnikom su preuzete odredbe Direktive 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 7. svibnja 2002. godine o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje.

STRANICA 8 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. **NARODNE** **NOVINE** SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

U prikladnu se posudu (npr. aluminijski tanjur veličine 20×12 cm s rubom 0,5 cm) odvagane 50 g *neusitnjenog* uzorka s preciznošću od 10 mg (sabijena ili zgusnuta hrana za životinje može se po potrebi ugrubo razdijeliti). Ostavi se sušiti u sušioniku na $60 - 70$ °C, sve dok se udio vode ne smanji na $8 - 12\%$. Posuda se izvadi iz sušionika i jedan sat hladi bez poklopca u laboratoriju, zatim se izvaže s preciznošću od 10 mg. Hrana za životinje se odmah usitni, sukladno točki 4.1.1. ovoga Dijela i suši, sukladno točki 4.2.1. ili 4.2.3 ovoga Dijela, ovisno o vrsti hrane za životinje.

4.3.2. Žitarice

Zrnje sa udjelom vode većim od 17% mora se prethodno sušiti na sljedeći način:

U prikladnu se posudu (npr. aluminijski tanjur veličine 20 × 12 cm s rubom 0,5 cm) odvagne 50 g *neusitnjenog* uzorka s preciznošću od 10 mg. Ostavi se sušiti 5 do 7 minuta u sušioniku na 130 °C. Posuda se izvadi iz sušionika i dva sata hladi bez poklopca u laboratoriju, zatim se izvaže s preciznošću od 10 mg. Uzorak se odmah usitni, sukladno točki 4.1.2. ovoga Dijela, i osuši, sukladno točki 4.2.2. ovoga Dijela.

5. Izračun rezultata

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

5.1. *Sušenje bez prethodnog sušenja*

pri čemu je:

m = početna masa testnog uzorka u gramima;

m_0 = masa testnog uzorka nakon sušenja u gramima.

5.2. *Sušenje s prethodnim sušenjem*

pri čemu je:

m = početna masa testnog uzorka u gramima;

m_1 = masa testnog uzorka nakon prethodnog sušenja u gramima;

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

m_0 = masa testnog uzorka nakon sušenja u gramima.

5.3. *Ponovljivost (engl. repeatability)*

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prelaziti 0,2% apsolutne vrijednosti vode.

6. Napomena

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

Dio B.

ODREĐIVANJE VODE U MASTIMA I ULJIMA

ŽIVOTINJSKOG I BILJNOG PODRIJETLA

1. Svrha i opseg primjene

Ova se metoda koristi za određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u mastima i uljima životinjskog i biljnog podrijetla.

4.1.2. *Žitarice i gruba krupica*

Uzima se najmanje 50 g uzorka. Uzorak se samelje tako da najmanje 50% čestica prolazi kroz sito s očicama veličine 0,5 mm, a na

situ s okruglim oćicama veličine 1 mm ostane najviše 10% ćestica.

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

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

4.2. Sušenje

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

ovoga Dijela

Izvaže se posuda (toćka 3.3. ovoga Dijela) s poklopcem s preciznošću od 1 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno rasporedi. Posuda se bez poklopca stavi u sušionik prethodno zagrijan na 103 °C. Posuda se stavi u sušionik što je moguće brže kako bi se sprijećio prevelik pad temperature. Sušenje traje ćetiri sata od trenutka kada temperatura u sušioniku ponovo dosegne 103 °C. Posuda se pokrije poklopcem, izvadi iz sušionika, ostavi hladiti u eksikatoru (toćka 3.6. ovoga Dijela) 30 do 45 minuta i izvaže s preciznošću od 1 mg.

Hrana za životinje koja se sastoji uglavnom od ulja i masti suši se u sušioniku dodatnih 30 minuta na 130 °C. Razlika između dva vaganja ne smije biti veća od 0,1% vode.

4.2.2. Žitarice, brašno, gruba krupica i sitna krupica

Izvaže se posuda (toćka 3.3. ovoga Dijela) s poklopcem s preciznošću od 0,5 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno rasporedi. Posuda se bez poklopca stavi u sušionik prethodno zagrijan na 130 °C. Posuda se stavi u sušionik što je moguće brže kako bi se sprijećio prevelik pad temperature. Sušenje traje dva sata od trenutka kada temperatura u sušioniku ponovo dosegne 130 °C. Posuda se pokrije s poklopcem, izvadi iz sušionika, ostavi hladiti u eksikatoru (toćka 3.6 ovoga Dijela) 30 do 45 minuta i izvaže s preciznošću od 1 mg.

4.2.3. Krmne smjese koje sadrže više od 4% saharoze ili laktoze:

krmiva poput rogaća, hidroliziranih proizvoda od žitarica, sjemenke slada, sušeni mljeveni repini rezanci, ribe i otopine šećera; krmne smjese koje sadrže više od 25% mineralnih soli uključujući vodu nakon kristalizacije.

Izvaže se posuda (toćka 3.3. ovoga Dijela) s poklopcem s preciznošću od 0,5 mg. U izvaganu se posudu odvagne približno 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i ravnomjerno rasporedi. Posuda se bez poklopca stavi u vakuumski sušionik (toćka 3.5. ovoga Dijela)

zagrijan na 80 – 85 °C. Posuda se stavi u sušionik što je moguće brže kako bi se spriječio prevelik pad temperature.

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

4.3. Prethodno sušenje

4.3.1. Ostala hrana za životinje, osim one iz točke 4.3.2.

ovoga Dijela

Kruta hrana za životinje s visokim udjelom vode koja se teško drobi mora se prethodno sušiti na sljedeći način:

2. Postupak

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

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

3. Reagensi

3.1. Kalijev 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 zncima

3.4. Sulfatna kiselina, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/mL}$

3.5. Sulfatna kiselina, standardna volumetrijska otopina, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/L}$

3.6. Sulfatna kiselina, standardna volumetrijska otopina,

$c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/L}$

3.7. Sulfatna kiselina, standardna volumetrijska otopina,

$c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/L}$

3.8. Indikator metilno crvenilo; otopi se 300 mg metilnog crvenila u 100 mL etanola, $\sigma = 95 - 96\%$ (v/v)

3.9. Otopina natrijevog hidroksida (moguća uporaba tehničke čistoće) $\beta = 40 \text{ g/100 mL}$ (m/v: 40%)

3.10. Natrijev hidroksid, standardna volumetrijska otopina,

$c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/L}$

3.11. Natrijev hidroksid, standardna volumetrijska otopina,

$c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/L}$

3.12. Plovućac u zrnu, ispran u kloridnoj kiselini i kalciniran

3.13. Acetanilid (talište = 114°C , udio N = 10,36%)

3.14. Saharoza (bez dušika)

3.15. Borna kiselina (H_3BO_3)

3.16. Otopina indikatora metilnog crvenila: otopi se 100 mg metilnog crvenila u 100 mL etanola ili metanola.

3.17. Otopina bromkrezol zelenila: otopi se 100 mg bromkrezol zelenila u 100 mL etanola ili metanola.

3.18. Otopina borne kiseline (10 – 40 g/L, ovisno o opremi koja se koristi).

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

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

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

3.19. Kloridna kiselina, standardna volumetrijska otopina,

$c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/L}$

Napomena: Mogu se koristiti i druge koncentracije volumetrijskih otopina (točke 3.5., 3.6., 3.7., 3.10., 3.11. i 3.19. ovoga Dijela),

2. Postupak

Uzorak se osuši do konstantne mase (gubitak mase između dva

uzastopna vaganja ne smije prijeći 1 mg) na 103 °C. Gubitak mase utvrđuje se vaganjem.

3. Oprema

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

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

3.3. Pješčana kupelj ili električna grijaća ploča

3.4. Eksikator s učinkovitim sredstvom za isušivanje

3.5. Analitička vaga

4. Postupak

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

Smanji se dovod topline, pri čemu se nadzire učestalost ispuštanja mjehurića na dnu posude. Temperatura ne smije prijeći 105 °C.

Nastavi se miješati uz struganje dna posude sve dok prestane ispuštanje mjehurića.

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

Napomena: Povećanje mase uzorka nakon uzastopnog zagrijavanje upućuje na oksidaciju masti, kada se rezultat izračunava na temelju vaganja izvršenog neposredno prije početka povećavanja mase.

5. Izračun rezultata

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

pri čemu je:

m = masa testnog uzorka u gramima;

m₁ = masa posude sa sadržajem prije zagrijavanja u gramima;

m₂ = masa posude sa sadržajem nakon zagrijavanja u gramima.

Rezultati manji od 0,05% navode se kao » manji od 0,05% «.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 0,05% apsolutne vrijednosti.

Dio C.

ODREĐIVANJE UDJELA SIROVIH BJELANČEVINA

1. Svrha i opseg primjene

Ova se metoda koristi za određivanje udjela sirovih bjelančevina u hrani za životinje na temelju udjela dušika određenog metodom po Kjeldahlu.

5.3.1. *Sulfatna kiselina*

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

5.3.2. *Borna kiselina*

Titrirajte sadržaj tikvice za prikupljanje sa standardnom volumetrijskom otopinom kloridne kiseline (točka 3.19. ovoga Dijela) ili standardnom volumetrijskom otopinom sulfatne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela), pri čemu se koristi bireta i očita se količina korištenog titranta.

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

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

Treba se pridržavati proizvođačevih uputa kod rukovanja određenim tipom destilatora ili destilatora/titratora.

Napomena.

Kod automatskog sustava titriranja, titracija započinje odmah po početku destilacije, a koristi se otopina 1% borne kiseline (točka 3.18. ovoga Dijela).

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

U ovom se slučaju koristi automatski titrator s pH-metrom.

Pravilno baždarenje pH-metra provodi se u području vrijednosti pH 4 do pH 7 uobičajenim laboratorijskim postupcima za baždarenje pH-metra.

Točka ekvivalencije pH titracije doseže se pri pH 4,6, kada je nagib titracijske krivulje najviši (točka infl eksije).

5.4. *Slijepa proba*

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

6. Izračun rezultata

Izračuni se vrše sukladno točki 6.1. ili 6.2. ovoga Dijela.

6.1. *Izračun za titraciju sukladno točki 5.3.1.*

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

pri čemu je:

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

V_1 = volumen (mL) NaOH (točka 3.10. ili 3.11. ovoga Dijela) korišten kod titracije uzorka;

c = koncentracija (mol/L) natrijevog hidroksida (točka 3.10. ili 3.11. ovoga Dijela);

m = masa (g) uzorka.

6.2. *Izračun za titraciju sukladno točki 5.3.2. ovoga Dijela*

6.2.1. *Titracija kloridnom kiselinom*

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

ako se to uzima u obzir u izračunima. Koncentracije se uvijek navode na četiri decimalna mjesta.

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. *Razgradnja*

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

Tikvica se prvo lagano zagrijava i po potrebi povremeno protrese,

sve dok masa potpuno ne pougljeni i nestane pjena; zatim se jače zagrijava do ravnomjernog vrenja tekućine. Zagrijavanje je primjereno ako se vrela kiselina kondenzira na stjenkama tikvice. Treba izbjegavati pregrijavanje stjenki i prijanjanje organskih čestica. Kada se otopina razbistri i postane svijetlo zelena, ostavi se ključati još 2 sata, zatim se ostavi ohladiti.

5.2. *Destilacija*

Oprezno se doda dovoljna količina vode da se sulfati potpuno otope. Ostavi se ohladiti i po potrebi doda nekoliko zrnaca cinka (točka 3.3. ovoga Dijela). Nastavlja se sukladno točki 5.2.1 ili 5.2.2. ovoga Dijela.

5.2.1. *Destilacija u sulfatnoj kiselini*

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

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

5.2.2. *Destilacija u bornoj kiselini*

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

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

Napomena: u polautomatskoj destilacijskoj jedinici dodavanje suviška natrijevog hidroksida i destilacija parom automatizirani su

postupci.

5.3. Titracija

Postupa se sukladno točki 5.3.1. ili 5.3.2. ovoga Dijela

8.4. Kod rutinske analize za određivanje sirovih bjelančevina mogu se koristiti zamjenske analitičke metode, iako je metoda po Kjeldahlu, opisana u Dijelu C, referentna metoda. Za svaki matriks pojedinačno treba dokazati da su rezultati dobiveni zamjenskom metodom (npr. DUMAS) jednakovrijedni rezultatima dobivenim referentnom metodom. U izvješću o analizi treba navesti analitičku metodu korištenu za određivanje sirovih bjelančevina budući da rezultati dobiveni zamjenskom metodom, čak i nakon potvrde jednakovrijednosti, mogu odstupati od rezultata dobivenih referentnom metodom.

Dio D.

ODREĐIVANJE UREE

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje sadržaja uree u hrani za životinje.

2. Načelo

Uzorak se suspendira u vodi u prisutnosti tvari za bistrenje.

Suspenzija se fi ltrira. Udio uree u fi ltratu određuje se nakon dodavanja 4-dimetilaminobenzaldehida (4-DMAB) mjerenjem optičke gustoće na valnoj duljini od 420 nm.

3. Reagensi

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

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

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

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

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

4. Oprema

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

4.2. Epruvete: 160×16 mm s ubrušenim čepovima

4.3. Spektrofotometar

5. Postupak

5.1. *Analiza uzorka*

Odvagne se 2 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese se 1 g aktivnog ugljena (točka 3.4. ovoga Dijela) u odmjernu tikvicu volumena 500 mL. Doda se 400 mL vode i 5 mL otopine Carrez I (točka 3.2. ovoga Dijela), miješa približno 30 sekundi i doda 5 mL otopine Carrez II (točka 3.3. ovoga Dijela). Miješa se 30 minuta na miješalici. Dopuni se vodom do oznake, protrese i fi ltrira.

Uzme se 5 mL prozirnog bezbojnog fi ltrata i prenese u epruvete s ubrušenim čepovima, doda 5 mL otopine 4-DMAB (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa. Epruvete se postave u vodenu kupelj na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nakon 15 minuta spektrofotometrom se izmjeri optička gustoća otopine uzorka na 420 nm. Rezultat se usporedi s otopinom reagensa iz slijepa probe.

5.2. *Kalibracijska krivulja*

Uzme se 1, 2, 4, 5 i 10 mL otopine uree (točka 3.5. ovoga Dijela) i prenese u odmjerne tikvice volumena 100 mL koje se dopune vodom do oznake. Od svake se otopine pipetom uzme 5 mL, u svaku se doda 5 mL otopine 4-DMAB (točka 3.1. ovoga Dijela), homogepru čemu je:

m = masa (g) testnog uzorka;

c = koncentracija (mol/L) standardne volumetrijske otopine kloridne kiseline (točka 3.19.

ovoga Dijela);

V_0 = volumen (mL) kloridne kiseline korišten u slijepoj probi;

V_1 = volumen (mL) kloridne kiseline korišten u testnom uzorku.

6.2.2. *Titracija sa sulfatnom kiselinom*

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

pri čemu je:

m = masa (g) testnog uzorka;

c = koncentracija (mol/L) standardne volumetrijske otopine sulfatne kiseline (točka 3.6.

ovoga Dijela);

V_0 = volumen (mL) sulfatne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela) korišten u slijepoj probi;

V_1 = volumen (mL) sulfatne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela)

korišten u testnom uzorku.

7. Provjera metode

7.1. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 0,2% apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina manji od 20%,
- 1,0% veće vrijednosti za udio sirovih bjelančevina u rasponu od 20 – 40%,
- 0,4% apsolutne vrijednosti za udio sirovih bjelančevina veći od 40%.

7.2. *Točnost*

Za analizu (razgradnja, destilacija, titracija) koristi se 1,5 do 2,0 g acetanilida (točka 3.13. ovoga Dijela) uz dodatak 1 g saharoze (točka 3.14. ovoga Dijela); za 1 g acetanilida koristi se 14,80 mL sulfatne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela). Iskorištenje mora iznositi najmanje 99%.

8. *Napomene:*

8.1. Oprema može biti ručna, poluautomatska ili automatska.

Ako je u radu opreme potreban prijenos između razgradnje i destilacije, taj se prijenos mora izvršiti bez gubitka. Ako tikvica uređaja za destilaciju nije opremljena lijevkom za dokapavanje, natrijev se hidroksid dodaje neposredno prije priključivanja tikvice na kondenzator, pri čemu se tekućina ulijeva polako niz stjenke tikvice.

8.2. Ako se sadržaj tikvice stvrdnjava, postupak određivanja započinje se iznova, ali s količinom sulfatne kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela) većom od gore navedene.

8.3. Kod proizvoda s niskim udjelom dušika volumen sulfatne kiseline (točka 3.7. ovoga Dijela) koji se dodaje u tikvicu za prikupljanje, po potrebi se može smanjiti na 10 ili 15 mL, a tikvica se dopuni vodom do 25 mL.

vog karbonata (točka 3.4. ove Glave) i poklopac hermetički zatvori.

Članak se oprezno okreće u vodoravnoj ravnini tako da se reagensi pomiješaju. Ostavi se najmanje četiri sata na sobnoj temperaturi ili jedan sat na temperaturi 40 °C.

Mikrobiretom (točka 4.3. ove Glave) se hlapljive baze u otopini

borne kiseline titiraju sulfatnom kiselinom (točka 3.5. ove Glave).
Slijepa se proba izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

6. Izračun rezultata

1 mL H_2SO_4 0,01 mol/L odgovara 0,34 mg amonijaka.

Rezultat analize iskazuje se kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 10% relativne vrijednosti za udio amonijaka manji od 1,0%,
- 0,1% apsolutne vrijednosti za udio amonijaka 1,0% ili veći.

7. Napomena

Ako je udio amonijaka u uzorku veći od 0,6% početni se fi ltrat razrijedi.

Slika 1.

CONWAYEV ČLANAK

Omjer 1/1

(1) (2)

(3) (4)

(1) Poprečni presjek poklopca $S_2 S_3$

(2) Poprečni presjek poklopca $S S_1$

(3) Tlocrt članka

(4) Tlocrt poklopca od brušenog stakla

nizira i izmjeri optička gustoća, kako se navodi gore, u usporedbi s kontrolnom otopinom koja sadrži 5 mL 4-DMAB i 5 mL vode bez uree. Pripremi se kalibracijska krivulja.

6. Izračun rezultata

Količina uree u uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. Napomene

7.1. Ako udio uree prelazi 3%, uzorak se smanji na 1 g ili se početna otopina razrijedi tako da u 500 mL nema više od 50 mg uree.

7.2. Ako je udio uree nizak, uzorak se povećava sve dok je fi ltrat proziran i bezbojan.

7.3. Ako uzorak sadrži jednostavne dušične spojeve, poput aminokiselina, optička se gustoća mjeri na 435 nm.

Dio E.

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH DUŠIKOVIH BAZA

Glava I.

MIKRODIFUZIJA

1. Svrha i opseg primjene

Ova se metoda koristi za određivanje udjela hlapljivih dušikovih baza u hrani za životinje iskazanog kao amonijak.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira vodom, otopina se izbistri i filtrira. Hlapljive dušične baze istiskuju se mikrodifuzijom uporabom otopine kalijevog karbonata, prikupe u otopinu borne kiseline i titiraju sulfatnom kiselinom.

3. Reagensi

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

3.2. Indikator: otopi se 33 mg bromkrezol zelenila i 65 mg metilnog crvenila u 100 mL 95 – 96% etanola (v/v).

3.3. Otopina borne kiseline: u odmjernoj tikvici volumena od 1 litre otopi se 10 g borne kiseline u 200 mL 95 – 96% etanola (v/v) i 700 mL vode. Doda se 10 mL indikatora (točka 3.2. ove Glave). Promiješa se, a po potrebi dodavanjem otopine natrijevog hidroksida boja otopine se podese na svijetlo crvenu. Količina od 1 mL te otopine vezat će najviše 300 µg NH₃.

3.4. Zasićena otopina kalijevog karbonata: u 100 mL vrele vode otopi se 100 g kalijevog karbonata. Ostavi se ohladiti, a zatim filtrira.

3.5. Sulfatna kiselina, 0,01 mol/L

4. Oprema

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

4.2. Stakleni ili plastični Conwayevi članci (vidi sliku 1.)

4.3. Mikrobirete graduirane s podjelom 1/100 mL

5. Postupak

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 mL vode u odmjernu tikvicu volumena 200 mL. Promiješa se ili protrese u rotacijskoj miješalici tijekom 30 minuta. Doda se 50 mL otopine trikloroctene kiseline (točka 3.1. ove Glave), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i filtrira kroz nabrani filter.

Pipetom se doda 1 mL otopine borne kiseline (točka 3.3. ove Glave) u srednji dio Conwayevog članka i 1 mL filtrata uzorka u gornji dio članka. Djelomično se pokrije namašćenim poklopcem.

U gornji dio članka brzo se nakapa 1 mL zasićene otopine kalijevog karbonata.

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

2. Načelo

2.1. *Slobodne aminokiseline*

Slobodne aminokiseline ekstrahiraju se razrijeđenom kloridnom kiselinom. Koekstrahirane dušične makromolekule istalože se sulfosalicilnom kiselinom i uklone fi ltriranjem. Vrijednost pH fi ltrirane otopine podesi se na 2,20. Aminokiseline se razdvoje ionskoizmjenjivačkom kromatografijom i odrede reakcijom s ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm.

2.2. *Ukupne aminokiseline*

Odabir postupka ovisi o ispitivanim aminokiselinama. Cist(e)in i metionin se prije hidrolize moraju oksidirati u cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon. Tirozin se mora odrediti u hidrolizatima neoksidiranih uzoraka. Sve druge aminokiseline navedene u točki 1. ovoga Dijela mogu se odrediti u oksidiranom ili neoksidiranom uzorku. Oksidacija se vrši na 0°C mješavinom peroksimravljje kiseline i fenola. Višak oksidacijskog reagensa razgradi se natrijevim disulfidom. Oksidirani ili neoksidirani uzorak se 23 sata hidrolizira kloridnom kiselinom (točka 3.20. ovoga Dijela). Vrijednost pH hidrolizata se podesi na 2,20. Aminokiseline se razdijele ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom i odrede reakcijom s ninhidrinom fotometrijskom detekcijom na 570 nm (440 nm za prolin).

3. Reagensi

Obvezno se koristi dvostruko destilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost < 10 µS)

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

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

3.3. Fenol

3.4. Natrijev disulfid

3.5. Natrijev hidroksid

3.6. 5-sulfosalicilna kiselina dihidrat

3.7. Kloridna kiselina, gustoće približno 1,18 g/mL

3.8. Trinatrij citrat dihidrat

3.9. 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol)

3.10. Natrijev klorid

3.11. Ninhidrin

3.12. Lagani petrolej, vrelište 40 – 60 °C

3.13. Norleucin ili drugi spoj primjeren za uporabu kao interni standard

3.14. Plinoviti dušik (< 10 ppm kisika)

3.15. 1-oktanol

3.16. Aminokiseline

3.16.1. Standardne tvari iz točke 1. Čisti spojevi bez kristalizirane vode. Prije uporabe suše se 1 tjedan u vakumu s P_2O_5 ili H_2SO_4 .

3.16.2. Cisteinska kiselina

3.16.3. Metionin-sulfon

3.17. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 7,5 \text{ mol/L}$:

U vodi se otopi 300 g NaOH (točka 3.5. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

Glava II.

DESTILACIJA

1. Svrha i opseg primjene

Ova se metoda koristi za određivanje udjela hlapljivih dušikovih baza, iskazanih kao amonijak, u ribljem brašnu koje praktično ne sadrži ureu. Koristi se samo za udio amonijaka niži od 0,25%.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira vodom, a otopina izbistri i fi ltrira. Hlapljive dušične baze se istisnu na temperaturi vrelišta dodavanjem magnezijevog oksida i prikupe u određenoj količini sulfatne kiseline, suvišak koje se titrira otopinom natrijevog hidroksida.

3. Reagensi

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

3.2. Magnezijev oksid.

3.3. Emulzija protiv pjenjenja (npr. silikon).

3.4. Sulfatna kiselina, 0,05 mol/L.

3.5. Otopina natrijevog hidroksida, 0,1 mol/L.

3.6. Otopina metilnog crvenila 0,3% u 95 – 96% etanolu (v/v).

4. Oprema

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

4.2. Uređaj za destilaciju po Kjeldahlu.

5. Postupak

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 mL vode u odmjernu tikvicu volumena 200 mL. Promiješa se ili protrese u rotacijskoj miješalici tijekom 30 minuta. Doda se 50 mL otopine trikloroctene kiseline (točka 3.1. ove Glave), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i fi ltrira kroz nabrani fi ltar papir. Pipetom se prenese količina bistrog fi ltrata koja odgovara očekivanom

udjelu hlapljivih dušikovih baza (obično je dovoljno 100 mL). Razrijedi se na 200 mL, doda se 2 g magnezijevog oksida (točka 3.2. ove Glave) i nekoliko kapi emulzije protiv pjenjenja (točka 3.3. ove Glave). Otopina mora biti alkalna pri pokusu s lakmusovim papirom; ako to nije slučaj, doda se magnezijev oksid (točka 3.2. ove Glave). Postupa se sukladno točkama 5.2. i 5.3. Dijela C ovog Priloga, tj. analitičke metode za određivanje udjela sirovih bjelančevina. Slijepa se proba izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

6. Izračun rezultata

1 mL H₂SO₄ 0,05 mol/L odgovara 1,7 mg amonijaka.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Relativna razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 10% relativne vrijednosti amonijaka.

Dio F.

ODREĐIVANJE AMINOKISELINA (OSIM TRIPTOFANA)

1. Svrha i opseg primjene

Ova se metoda koristi za određivanje slobodnih (sintetičkih i prirodnih) i ukupnih (vezanih na peptide i slobodnih) aminokiselina u hrani za životinje pomoću analizatora aminokiselina. Koristi se

STRANICA 14 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. **NARODNE**
NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

i metionin-sulfon i c = 10 nmol/50 µL za druge aminokiseline. U čaši volumena 100 mL otopi se 2,2 g natrijevog klorida (točka 3.10. ovoga Dijela) s 30 mL citratnog pufera (točka 3.24. ovoga Dijela). Doda se 4,00 mL osnovne standardne otopine aminokiseline (točka 3.27.1. ovoga Dijela), 4,00 mL osnovne standardne otopine cisteinske kiseline i metionin-sulfona (točka 3.27.2. ovoga Dijela) i 0,50 mL osnovne standardne otopine internog standarda (točka 3.27.3. ovoga Dijela), ako se isti koristi. Korištenjem natrijevog hidroksida pH vrijednost se podesi na 2,20 (točka 3.18. ovoga Dijela). Sadržaj se kvantitativno prebaci u odmjernu tikvicu volumena 50 mL, dopuni citratnim puferom (točka 3.24. ovoga Dijela) do oznake i promiješa.

Pohrani se na rok ne duži od 3 mjeseca na temperaturi nižoj

od 5 °C.

Vidi također napomenu pod točkom 9.1. ovoga Dijela.

3.27.5. Pripremi se kalibracijska otopina standardnih aminokiselina koja se koristi s hidrolizatima sukladno točki 5.3.3.1. ovoga Dijela, a za ekstrakte sukladno točki 5.2. ovoga Dijela. Kalibracijska otopina se pripremi sukladno točki 3.27.4. ovoga Dijela, ali bez natrijevog klorida.

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

4. Oprema

4.1. Tikvica s okruglim dnom volumena 100 ili 250 mL s povratnim hladilom.

4.2. Staklena posuda od borosilikatnog stakla volumena 100 mL s navojnim čepom obloženim gumom/tefl onom (npr. Duran, Schott) za uporabu u sušioniku.

4.3. Sušionik s prisilnom ventilacijom i regulatorom temperature točnosti veće od $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.4. pH metar (na tri decimalna mjesta)

4.5. Membranski fi ltar (0,22 μm).

4.6 Centrifuga.

4.7. Rotacioni vakuum otparivač.

4.8. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica.

4.9. Analizator aminokiselina ili oprema za HPLC opremljena kolonom za izmjenu iona, napravom za ninhidrin, derivatizaciju nakon kolone i fotometrijskim detektorom.

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

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

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

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

Uzorci s visokim udjelom vode moraju se prije mljevenja osušiti na

3.18. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 1 \text{ mol/L}$:

U vodi se otopi 40 g NaOH (točka 3.5. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.19. Mravlja kiselina – otopina fenola:

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

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

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

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

3.22. 5-sulfosalicilna kiselina, $s = 6\%$:

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

3.23. Oksidacijska smjesa (peroksimravlja kiselina – fenol):

Pomiješa se 0,5 mL vodikovog peroksida (točka 3.1. ovoga Dijela) s 4,5 mL otopine mravlje kiseline i fenola (točka 3.19. ovoga Dijela) u maloj čaši. Inkubira se 1 sat na 20 – 30 °C kako bi se dobila peroksimravlja kiselina, zatim se hladi u ledenoj kupelji (15 min) prije dodavanja u uzorak.

Upozorenje: Izbjegavati dodir s kožom i nositi zaštitnu odjeću.

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

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

3.25. Puferi za eluiranje, pripravljeni sukladno uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9. ovoga Dijela).

3.26. Reagens ninhidrin, pripravljen sukladno uputama za analizator koji se koristi (točka 4.9. ovoga Dijela).

3.27. Standardne otopine aminokiselina. Ove se otopine drže na temperaturi ispod 5 °C.

3.27.1. Osnovna standardna otopina aminokiselina (točka

3.16.1. ovoga Dijela).

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

Komercijalno je dostupna.

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

U odmjerne tikvici obujma 1 L otopi se 0,2115 g cisteinske kiseline (točka 3.16.2. ovoga Dijela) i 0,2265 g metionin-sulfona (točka 3.16.3. ovoga Dijela) u citratnom puferu (točka 3.24. ovoga Dijela) i dopuni citratnim puferom do oznake. Pohrani se na rok ne duži od 12 mjeseci na temperaturi nižoj od 5°C . Ta se otopina ne koristi ako osnovna standardna otopina (točka 3.27.1. ovoga Dijela) sadrži cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon.

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

U odmjerne se tikvici otopi 0,6560 g norleucina (točka 3.13. ovoga Dijela) u citratnom puferu (točka 3.24. ovoga Dijela) i dopuni citratnim puferom do 250 mL. Pohrani se na rok ne duži od 6 mjeseci na temperaturi nižoj od 5°C .

3.27.4. Kalibracijska otopina standardnih aminokiselina koja se koristi s hidrolizatima, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{L}$ za cisteinsku kiselinu

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 15

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

5.3.2.2. Hidroliza neoksidiranih uzoraka

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

5.3.2.3. Otvorena hidroliza

U smjesu koja se nalazi u tikvici (pripremljenu sukladno točki 5.3.2.1. ili 5.3.2.2. ovoga Dijela) dodaju se 3 staklene kuglice, zatim se ostavi ključati 23 sata uz stalno vrenje pod refl uksom. Po završetku hidrolize kondenzator se ispere s 5 mL citratnog pufera (točka 3.24. ovoga Dijela). Tikvica se odvoji i ohladi u ledenoj kupelji. Nastavlja se sukladno točki 5.3.3. ovoga Dijela.

5.3.2.4. Zatvorena hidroliza

Boca sa smjesom pripremljenom sukladno točki 5.3.2.1. ili

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

Ovisno o postupku za podešavanje pH (točka 5.3.3. ovoga Dijela) sadržaj posude sa citratnim puferom (točka 3.24. ovoga Dijela) se kvantitativno prenese u čašu volumena 250 mL ili tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL.

Nastavlja se sukladno točki 5.3.3. ovoga Dijela.

5.3.3. *Podešavanje pH*

Uzimajući u obzir odstupanje analizatora aminokiselina (točka 4.9. ovoga Dijela) za natrij, ugađanje pH se provodi sukladno točki 5.3.3.1. ili 5.3.3.2. ovoga Dijela.

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

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

U tom se slučaju hidrolizatu prije isparavanja dodaje 2,00 mL otopine internog osnovnog standarda (točka 3.27.3. ovoga Dijela).

U hidrolizat dobiven postupkom sukladno točki 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. dodaju se 2 kapi 1-oktanola (točka 3.15.).

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

Otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18. ovoga Dijela) vrijednost pH se podesi na 2,20 i zatim nastavi sukladno točki 5.3.4.

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

Hidrolizati dobiveni sukladno točki 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. ovoga Dijela djelomično se neutraliziraju opreznim dodavanjem, uz miješanje, 17 mL otopine natrijevog hidroksida (točka 3.17. ovoga Dijela), pri čemu se temperatura mora održavati ispod 40°C.

Na sobnoj temperaturi podesi se vrijednost pH na 2,20 prvotno otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.17. ovoga Dijela) i konačno zraku na temperaturi koja ne prelazi 50 °C ili liofilizacijom. Uzorci s visokim udjelom masti ekstrahiraju se laganim petrolejem (točka 3.12. ovoga Dijela) prije mljevenja.

5.2. Određivanje slobodnih aminokiselina u hrani za životinje i premiksima

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

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

Ako se koristi interni standard, za svakih 100 mL konačne otopine doda se 1,00 mL internog standarda (točka 3.27.3. ovoga Dijela) i dopuni otopinom pufera (točka 3.24. ovoga Dijela) do oznake. Nastavlja se s kromatografijom sukladno točki 5.4. ovoga Dijela. Ako se ekstrakti ne analiziraju isti dan, moraju se pohraniti na temperaturi nižoj od 5 °C.

5.3 Određivanje ukupnih aminokiselina

5.3.1 Oksidacija

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

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

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

Tikvica/boca se postavi u ledenu kupelj i ohladi na 0 °C, doda se 5 mL oksidacijske smjese (točka 3.23. ovoga Dijela) i miješa staklenom lopaticom sa zakrivljenim vrhom. Tikvica/boca s lopaticom se hermetički zatvori fi limom, a ledena kupelj s hermetički zatvorenom posudom stavi u hladnjak na 0 °C i ostavi 16 sati. Nakon 16 sati posuda se izvadi iz hladnjaka, a višak oksidacijskog reagensa se razgradi dodavanjem 0,84 g natrijevog disulfi ta (točka 3.4. ovoga Dijela). Nastavlja se sukladno točki 5.3.2.1. ovoga Dijela.

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. Hidroliza oksidiranih uzoraka

U oksidirani uzorak, pripravljen sukladno točki 5.3.1. ovoga Dijela, doda se 25 mL smjese za hidrolizu (točka 3.20. ovoga Dijela), pri čemu treba pažljivo isprati sve ostatke uzorka sa stjenke posude i lopatice.

Nastavlja se sukladno točki 5.3.2.3. ili 5.3.2.4. ovoga Dijela, ovisno o korištenom postupku hidrolize.

Ako se koristi interni standard pomnoži se sa: $\frac{D}{c}$

A = površina pika hidrolizata ili ekstrakta;

B = površina pika standardne kalibracijske otopine;

C = površina pika hidrolizata ili ekstrakta kao internog standarda;

D = površina pika standardne kalibracijske otopine kao internog standarda;

M = molekulska masa aminokiseline koja se određuje;

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

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

V = mL ukupnog hidrolizata (točka 5.3.4. ovoga Dijela) ili izračunati ukupni volumen otopine ekstrakta (točka 6.1. ovoga Dijela) u mL.

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

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

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

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

V = volumen konačnog ekstrakta.

7. Validacija metode

Metoda je provjerena u međulaboratorijskom ispitivanju na međunarodnoj razini provedenom 1990. godine na četiri različite vrste hrane za životinje (krmna smjesa za svinje, krmna smjesa za piliće u tovu, proteinske dopunske krmne smjese, premiks). Rezultati srednjih vrijednosti i standardne devijacije, bez ekstremnih vrijednosti, prikazani su u tablici u ovoj točki:

Srednje vrijednosti u g/kg

Referentni materijal Aminokiselina

Treonin Cist(e)in Metionin Lizin

Krmna smjesa za svinje 6,94

$n = 15$

3,01

$n = 17$

3,27

$n = 17$

9,55

$n = 13$

Krmna smjesa za piliće

u tovu

9,31

$n = 16$

3,92

$n = 18$

5,08

$n = 18$

13,93

$n = 16$

Proteinska dopunska krmna

smjesa

22,32

n = 16

5,06

n = 17

12,01

n = 17

47,74

n = 15

Premiks 58,42

n = 16

– 90,21

n = 16

98,03

n = 16

n = Broj uključenih laboratorija

7.1. *Ponovljivost*

Ponovljivost gore navedene međulaboratorijske usporedbe, iskazana kao » unutarlaboratorijska standardna devijacija «, prikazana je u donjoj tablici:

Unutarlaboratorijska standardna devijacija (s_r), iskazana u g/kg otopinom natrijevog hidroksida (točka 3.18. ovoga Dijela). Nastavlja se sukladno točki 5.3.4. ovoga Dijela.

5.3.4. *Otopina uzorka za kromatografiju*

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

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

Nastavlja se s kromatografijom (točka 5.4. ovoga Dijela).

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

5.4. *Kromatografija*

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

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

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

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

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

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

Sustav mora jamčiti razdvajanje lizina od » lizinskih artefakata « i ornitina.

6. Izračun rezultata

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

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 certifi ciranim referentnim materijalima, kada su dostupni.

Preporuča se izvršiti kalibraciju s certifi ciranom otopinom za kalibraciju aminokiselina.

9. Napomene

9.1. Zbog razlika između analizatora aminokiselina za smjernice se uzimaju konačne koncentracije otopina standardnih aminokiselina za kalibraciju (vidi točke 3.27.4. i 3.27.5. ovoga Dijela) i hidrolizata (vidi točku 5.3.4. ovoga Dijela).

Za sve aminokiseline treba provjeriti područje linearnog odziva uređaja.

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

9.2. Kada se za analizu hidrolizata koristi oprema za visokodjelatnu tekućinsku kromatografiju uvjeti pokusa moraju se optimizirati sukladno preporukama proizvođača.

9.3. Kod primjene metode za hranu za životinje koja sadrži više od 1% klorida (dopunske krmne smjese, mineralne mješavine, dopuna hrani za životinje (engl. *supplementary feeds*) može doći do preniske procjene udjela metionina, što zahtijeva posebnu obradu.

Dio G.

ODREĐIVANJE TRIPTOFANA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje ukupnog i slobodnog triptofana u hrani za životinje. Njom se ne omogućava razlikovanje između D- i L- oblika.

2. Načelo

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

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

Triptofan i interni standard u hidrolizatu ili ekstraktu određuju se postupkom HPLC s fl uorescentnom detekcijom.

3. Reagensi

3.1. Obvezno se koristi redestilirana voda ili voda jednake kakvoće (provodljivost $< 10 \mu\text{S/cm}$).

3.2. Standardna tvar: triptofan (čistoća/udio $\geq 99\%$), osušen pod vakuumom iznad fosfornog pentoksida.

3.3. Interna standardna tvar: α -metil-triptofan (čistoća/udio $\geq 99\%$), osušen pod vakuumom iznad fosfornog pentoksida.

3.4. Barijev hidroksid oktahidrat (treba paziti da se $\text{Ba(OH)}_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$ pretjerano ne izlaže zraku kako bi se izbjeglo nastajanje BaCO_3 koji može remetiti postupak određivanja) (vidi napomenu pod točkom 9.3. ovoga Dijela).

3.5. Natrijev hidroksid

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

3.7. Kloridna kiselina, $\rho_{20} 1,19 \text{ g/mL}$

Referentni materijal Aminokiselina

Treonin Cist(e)in Metionin Lizin

Krmna smjesa za svinje 0,13

n = 15

0,10

n = 17

0,11

n = 17

0,26

n = 13

Krmna smjesa za piliće

u tovu

0,20

n = 16

0,11

n = 18

0,16

n = 18

0,28

n = 16

Proteinska dopunska krmna

smjesa

0,48

n = 16

0,13

n = 17

0,27

n = 17

0,99

n = 15

Premiks 1,30

n = 16

— 2,19

n = 16

2,06

n = 16

n = Broj uključenih laboratorija

Koeficijent varijacije (%) za unutarlaboratorijsku standardnu devijaciju

(sr)

Referentni materijal Aminokiselina

Treonin Cist(e)in Metionin Lizin

Krmna smjesa za svinje 1,9

n = 15

3,3

n = 17

3,4

n = 17

2,8

n = 13

Krmna smjesa za piliće

u tovu

2,1

n = 16

2,8

n = 18

3,1

n = 18

2,1

n = 16

Proteinska dopunska

krmna smjesa

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

Standardna devijacija (sR) između laboratorija u g/kg

Referentni materijal Aminokiselina

Treonin Cist(e)in Metionin Lizin

Krmna smjesa za svinje 0,28

n = 15

0,30

n = 17

0,23

n = 17

0,30

n = 13

Krmna smjesa za piliće

u tovu

0,48

n = 16

0,34

n = 18

0,55

n = 18

0,75

n = 16

Proteinska dopunska

krmna smjesa

0,85

n = 16

0,62

n = 17

1,57

n = 17

1,24

n = 15

Premiks 2,49

n = 16

— 6,20

n = 16

6,62

n = 16

n = Broj uključenih laboratorija

Koeficijent varijacije (%) za standardne devijacije (sR) između laboratorija

Referentni materijal Aminokiselina

Treonin Cist(e)in Metionin Lizin

Krmna smjesa za

svinje

4,1

n = 15

9,9

n = 17

7,0

n = 17

3,2

n = 13

Krmna smjesa za piliće

u tovu

5,2

n = 16

8,8

n = 18

10,9

n = 18

5,4

n = 16

Proteinska dopunska

krmna smjesa

3,8

n = 16

12,3

n = 17

13,0

n = 17

3,0

n = 15

STRANICA 18 – BROJ 146 PONEĐJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HRVA TSKE

4.3. pH-metar

4.4. Polipropilenska tikvica, volumena 125 mL, sa širokim vratom i navojnim čepom

4.5. Membranski fi ltar, 0,45 µm

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

4.7. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica

4.8. Vrtložna miješalica

5. Postupak

5.1. Priprema uzoraka

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

Uzorci s visokim udjelom vode moraju se prije usitnjavanja osušiti na zraku na temperaturi koja ne prelazi 50 °C ili liofi lizacijom.

Uzorci s visokim udjelom masti ekstrahiraju se laganim petrolejem (točka 3.9. ovoga Dijela) prije usitnjavanja.

5.2. Određivanje slobodnog triptofana (ekstrakt)

Odvagne se primjerena količina (1 – 5 g) pripravljenog uzorka (točka 5.1. ovoga Dijela) s preciznošću od 1 mg i prenese u konusnu tikvicu. Doda se 100,0 mL kloridne kiseline (točka 3.13. ovoga Dijela) i 5,00 mL koncentrirane otopine internog standarda (točka 3.16. ovoga Dijela). Mućka se ili miješa 60 minuta mehaničkom tresilicom ili magnetskom miješalicom (točka 4.7. ovoga Dijela). Prićeka se da talog padne na dno i pipetom prenese 10,0 mL otopine supernatanta u ćašu. Doda se 5 mL ortofosforne kiseline (točka 3.14. ovoga Dijela). Natrijevim hidroksidom se pH vrijednost otopine (točka 3.10. ovoga Dijela) podese na 3. Doda se dovoljno metanola (točka 3.8. ovoga Dijela) kako bi u konaćnom volumenu koncentracija metanola iznosila između 10% i 30%. Prenese se u odmjernu tikvicu primjerenog volumena i razrijedi vodom na volumen potreban za kromatografiju (približno jednak volumen kao kod standardne kalibracijske otopine (točka 3.17. ovoga Dijela)).

Prije ubrizgavanja na kolonu za HPLC fi ltrira se nekoliko mL

otopine kroz membranski fi ltar 0,45 μm (točka 4.5. ovoga Dijela). Nastavlja se s kromatografi jom sukladno točki 5.4. ovoga Dijela. Standardna otopina i ekstrakti se zaštite od izravnog sunčevog svjetla. Ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se pohraniti na rok ne duži od 3 dana na 5 °C.

5.3. *Određivanje ukupnog triptofana (hidrolizat)*

Odvagne se 0,1 – 1 g pripravljenog uzorka (točka 5.1. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,2 mg i prenese u polipropilensku tikvicu (točka 4.4. ovoga Dijela). Udio dušika u odvaganom dijelu uzorka treba iznositi približno 10 mg. Doda se 8,4 mg barijevog hidroksid oktahidrata (točka 3.4. ovoga Dijela) i 10 mL vode. Miješa se vrtložnom miješalicom (točka 4.8. ovoga Dijela) ili magnetskom miješalicom (točka 4.7. ovoga Dijela). U smjesi se ostavi magnet obložen tefl onom. Stjenke posude se isperu s 4 mL vode. Tikvica se poklopi navojnim čepom i lagano zatvori. Prenese se u autoklav (točka 4.6. ovoga Dijela) s vrelom vodom i ostavi u pari 30 – 60 minuta. 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$, u toplu se smjesu doda 30 mL vode sobne temperature. Lagano se promućka ili promiješa. Doda se 2,00 mL koncentrirane otopine internog standarda (α -metil-triptofana) (točka 3.16. ovoga Dijela). Posude se 15 minuta hlade na vodenoj/ledenoj kupelji.

Zatim se doda 5 mL ortofosforne kiseline (točka 3.14. ovoga Dijela). Posuda se drži u hladnoj kupelji, uz protresanje neutralizira s HCl (točka 3.11. ovoga Dijela), pH vrijednost se podese na 3,0 s HCl (točka 3.12. ovoga Dijela). Doda se dovoljno metanola kako bi

3.8. Metanol, ekvivalent za HPLC čistoću

3.9. Lagani petrolej, vrelište 40 – 60 °C

3.10. Otopina natrijevog hidroksida, $c = 1 \text{ mol/L}$:

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

3.11. Kloridna kiselina, $c = 6 \text{ mol/L}$:

Uzme se 492 mL HCl (točka 3.7. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.12. Kloridna kiselina, $c = 1 \text{ mol/L}$:

Uzme se 82 mL HCl (točka 3.7. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.13. Kloridna kiselina, $c = 0,1 \text{ mol/L}$:

Uzme se 8,2 mL HCl (točka 3.7. ovoga Dijela) i dopuni vodom

do 1 litre.

3.14. Ortofosforna kiselina, $c = 0,5 \text{ mol/L}$:

Uzme se 34 mL ortofosforne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela)

i dopuni vodom (točka 3.1. ovoga Dijela) do 1 litre.

3.15. Koncentrirana otopina triptofana (točka 3.2. ovoga Dijela),

$c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/mL}$:

U odmjernej tikvici volumena 500 mL otopi se 0,2553 g triptofana

(točka 3.2. ovoga Dijela) u kloridnoj kiselini (točka 3.13. ovoga

Dijela) i dopuni kloridnom kiselinom (točka 3.13. ovoga Dijela) do

oznake. Pohrani se na rok ne duži od 4 tjedna na $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$.

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

mL:

U odmjernej tikvici volumena 500 mL otopi se 0,2728 g α -metiltriptofana

(točka 3.3. ovoga Dijela) u kloridnoj kiselini (točka 3.13.

ovoga Dijela) i dopuni kloridnom kiselinom (točka 3.13. ovoga Dijela)

do oznake. Pohrani se na rok ne duži od 4 tjedna na $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$.

3.17. Kalibracijska standardna otopina triptofana i internog

standarda:

Pripremi se 2,00 mL koncentrirane otopine triptofana (točka

3.15. ovoga Dijela) i 2,00 mL koncentrirane otopine internog standarda

(α -metil-triptofan) (točka 3.16. ovoga Dijela). Razrijedi se

vodom (točka 3.1. ovoga Dijela) i metanolom (točka 3.8. ovoga Dijela)

na približno jednak volumen i približno jednaku koncentraciju

metanola (10 – 30%) kao kod konačnog hidrolizata.

Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

Tijekom pripreme treba je zaštititi od izravnog sunčevog svjetla.

3.18. Octena kiselina

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

3.20. Etanolamin, $w \text{ (w/w)} > 98\%$

3.21. Otopina 1 g 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola (točka 3.19.

ovoga Dijela) u 100 mL metanola (točka 3.8. ovoga Dijela).

3.22. Mobilna faza za HPLC: 3,00 g octene kiseline (točka 3.18.

ovoga Dijela) + 900 mL vode (točka 3.1. ovoga Dijela) + 50,0 mL

otopine (točka 3.21. ovoga Dijela) 1,1,1-triklor-2-metil-2-propanola

(točka 3.19. ovoga Dijela) u metanolu (točka 3.8. ovoga Dijela) (1

g/100 mL). Etanolaminom se vrijednost pH podesi na 5,00 (točka

3.20. ovoga Dijela). Dopuni se vodom do 1000 mL (točka 3.1. ovoga

Dijela).

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa spektrofotometrijskim detektorom

4.2. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 125 mm x 4 mm C₁₈,
veličina čestica punila 3 µm ili ekvivalentna

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 19

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

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

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

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

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

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja,
izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 10% u odnosu na najviši
rezultat.

8. Rezultati studije međulaboratorijske suradnje

Provedena je međulaboratorijska studija na razini Europske
unije (u daljnjem tekstu EU), (četvrta međulaboratorijska usporedba),
u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo 3 uzorka za potvrđivanje
metode za hidrolizu. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati
su prikazani u donjoj tablici:

Uzorak 1

Krmna

smjesa za

svinje

Uzorak 2

Krmna smjesa za

svinje s dodanim

L-triptofanom

Uzorak 3

Dopunska

krmna smjesa

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

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate;

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

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti (engl. *reproducibility*);

r = ponovljivost;

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %;

CV_R = koeficijent varijacije u obnovljivosti %.

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EU (treća međulaboratorijska usporedba), u kojoj se u 13 laboratorija analiziralo 2 uzorka za potvrđivanje metode za ekstrakciju slobodnog triptofana. Svaki se uzorak analizirao pet puta. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

Uzorak 4

Smjesa pšenice

i soje

Uzorak 5

Smjesa pšenice i

soje (= uzorak 4) s

dodanim triptofanom

(0,457 g/kg 1)

L 12 12

n 55 60

u konačnom obujmu koncentracija metanola iznosila 10 – 30%. Prenese se u odmjernu tikvicu primjerenog volumena i razrijedi vodom do određenog volumena potrebnog za kromatografiju (na primjer, 100 mL). Dodavanje metanola ne smije izazvati taloženje.

Prije ubrizgavanja na HPLC kolonu nekoliko mL otopine se filtrira kroz membranski filter 0,45 μ m (točka 4.5. ovoga Dijela). Nastavlja se s kromatografijom sukladno točki 5.4. ovoga Dijela. Standardna otopina i hidrolizati se zaštite od izravnog sunčevog svjetla. Ako se ekstrakti ne mogu analizirati istog dana, mogu se pohraniti na rok ne duži od 3 dana na 5 °C.

5.4. HPLC određivanje

Za izokratsko se eluiranje kao smjernice predlažu sljedeći uvjeti; mogu se koristiti i drugi uvjeti ako se njima jamče jednakovrijedni rezultati (također vidi napomene pod točkama 9.1. i 9.2. ovoga Dijela).

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.2. ovoga Dijela): 125 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punila 3 μm iliekvivalentna

Temperatura kolone: sobna temperatura

Mobilna faza

(točka 3.22. ovoga Dijela): 3,00 g octene kiseline (točka 3.18.

ovoga Dijela) + 900 mL vode (točka

3.1. ovoga Dijela) + 50,0 mL otopine

(točka 3.21. ovoga Dijela) 1,1,1-triklor-

2-metil-2-propanola (točka 3.19. ovoga

Dijela) u metanolu (točka 3.8. ovoga

Dijela) (1 g/100 mL). Etanolaminom

se pH vrijednost otopine (točka 3.20.

ovoga Dijela) podese na 5,00. Dopuni

se vodom (točka 3.1. ovoga Dijela) do

1000 mL.

Brzina protoka: 1 mL/min

Ukupno vrijeme protoka: približno 34 min

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

Injektirani volumen: 20 μL

6. Izračun rezultata

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

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

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

V₁ = volumen u mL (2 mL) koncentrirane otopine triptofana (točka 3.15. ovoga Dijela) dodane kalibracijskoj otopini (točka 3.17. ovoga Dijela);

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

V₂ = volumen u mL koncentrirane otopine internog standarda (točka 3.16. ovoga Dijela) dodane pri ekstrakciji (točka 5.2. ovoga

Dijela) (= 5,00 mL) ili hidrolizatu (točka 5.3. ovoga Dijela) (= 2,00 mL);

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

STRANICA 20 – BROJ 146 PONEĐJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

Temperatura kolone: 32 °C

Mobilna faza: A: 0,01 mol/L KH₂PO₄/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 vrijeme protoka: oko 33 min

9.2. Postupak kromatografije se razlikuje s obzirom na vrstu HPLC i korišteni materijal za punjenje kolone. Odabrani sustav mora osiguravati razdvajanje bazne linije triptofana i internog standarda. Osim toga, važno je dobro odijeliti produkte razgradnje od triptofana i internog standarda. Propuštaju se hidrolizati bez internog standarda za provjeru bazne linije internog standarda na nečistoće. Važno je da vrijeme protoka bude dovoljno dugo za eluiranje svih produkata razgradnje, inače bi zakašnjeni pikovi protoka mogli remetiti kasnije postupke kromatografije ranja.

U radnom području kromatografski sustav mora imati linearni odziv. Linearni se odziv mjeri s konstantnom (uobičajenom) koncentracijom internog standarda i različitim koncentracijama triptofana.

Važno je da veličine pikova triptofana i internog standarda budu u linearnom području HPLC/fl uorescentnog sustava. Ako je pik triptofana i/ili internog standarda prenizak ili previsok, analizu treba ponoviti s drugom količinom uzorka i/ili drugim konačnim volumenom.

9.3. Barijev hidroksid

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

do niskih rezultata za triptofan.

Dio H.

ODREĐIVANJE SIROVIH ULJA I MASTI

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje sirovih ulja i masti u hrani za životinje. Ona ne obuhvaća analizu u sjemenkama uljarica i plodova uljarica.

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

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

Ova se metoda koristi za krmiva biljnog podrijetla, osim one koja je obuhvaćena opsegom primjene Postupka B.

1.2. *Postupak B – Ukupna sirova ulja i masti*

Ova se metoda koristi za krmiva životinjskog podrijetla i za sve krmne smjese. Koristi se za sva krmiva iz kojih se bez prethodne hidrolize ne mogu potpuno ekstrahirati ulja i masti (npr. gluteni, kvasac, krumpirovi proteini i proizvodi koji se podvrgavaju postupcima poput, ekstrudiranja, pahuljičanja i zagrijavanja).

1.3. *Tumačenje rezultata*

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

Srednja vrijednost [g/kg] 0,391 0,931

s_r [g/kg] 0,005 0,012

r [g/kg] 0,014 0,034

CV_r [%] 1,34 1,34

s_R [g/kg] 0,018 0,048

R [g/kg] 0,050 0,134

CV_R [%] 4,71 5,11

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate;

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

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

r = ponovljivost;

R = obnovljivost

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u %;

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Provedena je još jedna međulaboratorijska studija na razini EU

u kojoj se u 7 laboratorija analiziralo 4 uzorka za potvrđivanje triptofana

za hidrolizu. Rezultati su prikazani u donjoj tablici. Svaki se uzorak analizirao pet puta.

Uzorak 1

Krmne

smjese

za svinje

(CRM 117)

Uzorak 2

Riblje brašno s

niskim udjelom

masti

(CRM 118)

Uzorak 3

Sojino

brašno

(CRM 119)

Uzorak 4

Obrano

mlijeko u

prahu

(CRM 120)

L 7 7 7 7

n 25 30 30 30

Srednja 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

L = broj laboratorija koji su dostavili rezultate;

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

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

r = ponovljivost;

R = obnovljivost;

CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti u%;

CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti u%.

9. Napomene

9.1. Bolje razdvajanje triptofana i α -metil-triptofana može se

postići sljedećim kromatografskim uvjetima.

Izokratsko eluiranje, nakon čega slijedi gradijentno pročišćavanje kolone:

Kolona za tekućinsku

kromatografiju: 125 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica

punjenja 5 µm ili ekvivalentna

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 21

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HRVA TSKE

Dvostruki fi ltar papir na kojem je ostatak, prenese se na satno staklo i sat i pol suši u zračnom sušioniku (točka 4.3. ovoga Dijela) na 100 °C ± 3 °C.

Dvostruki fi ltar papir sa suhim ostatkom se prenese u tuljac za ekstrakciju (točka 4.2. ovoga Dijela) i pokrije čepom od vate koji ne sadrži masti. Tuljac se postavi u ekstraktor (točka 4.1. ovoga Dijela) i postupak nastavi kako se navodi u drugom i trećem stavku točke 5.1. ovoga Dijela.

6. Prikaz rezultata

Masa ostatka se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. Ponovljivost

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

- 0,2% apsolutne vrijednosti za udio sirovih ulja i masti manji od 5%,
- 4,0% u odnosu na najviši rezultat za udio od 5 – 10%,
- 0,4% apsolutne vrijednosti za udio iznad 10%.

8. Napomene

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

Odvagne se 20 g uzorka s preciznošću od 1 mg i pomiješa s

10 g ili više bezvodnog natrijevog sulfata (točka 3.2. ovoga Dijela).

Ekstrahira se laganim petrolejem (točka 3.1. ovoga Dijela) sukladno

točki 5.1. ovoga Dijela. Ekstrakt se dopuni laganim petrolejem do 500 mL (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa. Uzme se 50 mL otopine i prenese u malenu, suhu, izvaganu tikvicu s krhotinama plovuća.

Destilacijom se ukloni otapalo, osuši se i nastavi sukladno zadnjem stavku točke 5.1. ovoga Dijela

Iz ostatka ekstrakcije koji se nalazi u tuljcu ukloni se otapalo,

ostatak se usitni do veličine čestica 1 mm i vrati u tuljac za ekstrakciju (ne dodaje se natrijev sulfat), zatim se nastavi kako se navodi u drugom i trećem stavku točke 5.1. ovoga Dijela.

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

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

pri čemu je:

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

m_2 = masa ostatka nakon druge ekstrakcije u gramima.

8.2. Kod proizvoda s niskim udjelom ulja i masti testni se uzorak može povećati na 5 g.

8.3. Hranu za kućne ljubimce s visokim udjelom vode ponekad prije hidrolize i ekstrakcije trebati pomiješati s bezvodnim natrijevim sulfatom, sukladno Postupku B.

8.4. U točki 5.2. ovoga Dijela, za ispiranje ostatka nakon filtracije učinkovitije bi bilo koristiti vruću umjesto hladne vode.

8.5. Za određenu hranu za životinje možda će trebati produljiti vrijeme sušenja na više od 1 h i 30 min. Treba izbjegavati prekomjerno sušenje zato što može dovesti do niskih rezultata. Može se koristiti i mikrovalna pećnica.

8.6. Ako je udio sirovih ulja/masti viši od 15%, preporuča se prije hidrolize izvršiti prethodnu ekstrakciju sukladno Postupku A i ponovnu ekstrakciju sukladno Postupku B. U određenoj mjeri, to ovisi o vrsti hrane za životinje i vrsti ulja/masti u hrani za životinje.

2. Načelo

2.1. Postupak A

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

2.2. Postupak B

Uzorak se uz zagrijavanje obradi kloridnom kiselinom. Smjesa se ohladi i filtrira. Ostatak se ispere i osuši, zatim se provede određivanje sukladno Postupku A.

3. Reagensi

3.1. Lagani petrolej, vrelište 40 – 60 °C. Bromni broj mora biti niži od 1, a ostatak nakon isparavanja manji od 2 mg/100 mL.

3.2. Natrijev sulfat, bezvodni

3.3. Kloridna kiselina, $c = 3 \text{ mol/L}$

3.4. Filtracijsko sredstvo, npr. Kieselguhr, Hyfl o-supercel

4. Oprema

4.1. Uređaj za ekstrakciju. Ako je opremljen sifonom (uređaj Soxhlet), brzina refl ukša treba biti takva da proizvodi približno 10 ciklusa na sat; ako nije opremljena sifonom, brzina refl ukša treba iznositi približno 10 mL u minuti.

4.2. Tuljci za ekstrakciju, slobodni od tvari topljivih u laganom petroleju i poroznosti sukladno zahtjevima iz točke 4.1. ovoga Dijela.

4.3. Sušionik, ili vakuumski, postavljen na 75 °C $\pm$ 3 °C, ili zračni, postavljen na 100 °C $\pm$ 3 °C.

5. Postupak

5.1. *Postupak A* (vidi točku 8.1. ovoga Dijela)

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

Tuljac se postavi u ekstraktor (točka 4.1. ovoga Dijela) i šest sati ekstrahira laganim petrolejem (točka 3.1. ovoga Dijela). Ekstrakt laganog petroleja se prikupi u suhu, izvaganu tikvicu koja sadrži krhotine plovuća⁷.

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

5.2. *Postupak B*

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

Ohladi se i doda onoliko sredstva za fi ltriranje (točka 3.4. ovoga Dijela) koliko je potrebno da tijekom fi ltriranja ne dođe do gubitka ulja i masti. Filtrira se kroz navlažen dvostruki fi ltar papir koji je slobodan od masti. Ostatak se ispire hladnom vodom sve dok fi ltrat ne postane neutralan. Treba provjeriti da fi ltrat ne sadrži nikakva ulja ili masti. Njihova prisutnost znači da se uzorak prije hidrolize mora ekstrahirati laganim petrolejem prema Postupku A.

⁷ Kada se ulje ili mast podvrgavaju naknadnim testovima kakvoće, krhotine plovuća zamjenjuju se staklenim kuglicama.

Otvori se slavina na ispusnoj cijevi (točka 4.1. ovoga Dijela), sulfatna kiselina se pod vakuumom fi ltrira kroz fi ltarski lončić, ostatak se triput uzastopno ispere količinom od 30 mL proključale vode, pri čemu treba osigurati da se nakon svakog ispiranja ostatak fi ltrira do suhog.

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

Nakon konačnog ispiranja i sušenja, odvoji se lončić sa sadržajem i priključi na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6. ovoga Dijela). Ostatak u lončiću se pod vakuumom triput uzastopno ispere količinom od 25 mL acetona (točka 3.4. ovoga Dijela), pri čemu treba osigurati da se nakon svakog ispiranja ostatak fi ltrira do suhog. Lončić se osuši u sušioniku na 130°C do konstantne mase. Nakon svakog sušenja ohladi se u eksikatoru i brzo izvaži. Lončić se postavi u mufolnu peć i žari najmanje 30 minuta na 475 – 500 °C do konstantne mase (gubitak mase između dva uzastopna vaganja ne smije prijeći 2 mg).

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

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

6. Izračun rezultata

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

pri čemu je:

m = masa uzorka u gramima;

m_0 = gubitak mase nakon žarenja tijekom postupka određivanja, u gramima;

m_1 = gubitak mase nakon žarenja tijekom slijepe probe, u gramima.

7. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja,

izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 0,6% apsolutne vrijednosti za udio sirove vlaknine manji od 10%,
- 6% u odnosu na najviši rezultat za udio sirove vlaknine jednak ili veći od 10%.

8. Napomene

8.1. Hranu za životinje koja sadrži više od 10% sirovih masti prije analize treba odmastiti laganim petrolejem (točka 3.5. ovoga Dijela). Filtarski se lončić (točka 4.2. ovoga Dijela) sa svojim sadržajem spoji na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6. ovoga Dijela), ostatak se pod vakuumom triput ispere količinom od 30 mL laganog petroleja, pri čemu treba osigurati da je ostatak suh. Nakon što se lončić sa svojim sadržajem priključi na grijaću jedinicu (točka 4.1. ovoga Dijela), nastavlja se sukladno točki 5. ovoga Dijela.

8.2. Hranu za životinje koja sadrži masti koje se ne mogu direktno ekstrahirati laganim petrolejem (točka 3.5. ovoga Dijela), treba Dio I.

ODREĐIVANJE SIROVE VLAKNINE

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje bezmasnih organskih tvari u hrani za životinje koje su netopive u kiselim i baznim medijima i uobičajeno se nazivaju sirova vlaknina.

2. Načelo

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

3. Reagensi

3.1. Sulfatna kiselina, $c = 0,13 \text{ mol/L}$

3.2. Sredstvo protiv pjenjenja (npr. n-oktanol)

3.3. Sredstvo za filtriranje (Celite 545 ili ekvivalentno), koje se četiri sata grije na 500 °C (točka 8.6. ovoga Dijela)

3.4. Aceton

3.5. Lagani petrolej s vrelištem 40 – 60 °C

3.6. Kloridna kiselina, $c = 0,5 \text{ mol/L}$

3.7. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 0,23 \text{ mol/L}$

4. Oprema

4.1. Grijaća jedinica za razgradnju otopinama sulfatne kiseline i

kalijevog hidroksida, opremljena dodatkom za fi ltarski lončić (točka 4.2. ovoga Dijela) i ispusnom cijevi sa slavinom za tekućinu i vakuum, po mogućnosti sa stlačenim zrakom. Svakog dana prije početka upotrebe, jedinica se pet minuta zagrijava proključalom vodom.

4.2. Stakleni fi ltarski lončić s fi ltarskom pločom od sinteriranog stakla, veličine pora 40 – 90 μm . Prije prve upotrebe treba se nekoliko minuta grijati na 500 $^{\circ}\text{C}$ i ohladiti (točka 8.6. ovoga Dijela).

4.3. Valjak volumena najmanje 270 mL s povratnim hladilom, pogodan za ključanje.

4.4. Sušionik s termostatom

4.5. Mufolna peć s termostatom

4.6. Jedinica za ekstrakciju sastavljena od nosive ploče za fi ltarski lončić (točka 4.2. ovoga Dijela) i ispusne cijevi sa slavinom za tekućinu i vakuum.

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

5. Postupak

Odvagne se 1 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u lončić (točka 4.2. ovoga Dijela) (vidi napomene pod točkama 8.1., 8.2. i 8.3. ovoga Dijela) i doda 1 g sredstva za fi ltiranje (točka 3.3. ovoga Dijela).

Najprije se sklopi grijaća jedinica (točka 4.1. ovoga Dijela) i fi ltarski lončić (točka 4.2. ovoga Dijela), zatim se valjak (4.3. ovoga Dijela.) spoji na lončić. U spojeni valjak i lončić nalije se 150 mL proključale sulfatne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela) i po potrebi nekoliko kapi sredstva protiv pjenjenja (točka 3.2. ovoga Dijela).

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

Provjeri se koncentracija tako dobivenih reagensa (Cu 0,05 mol/L; Na_2CO_3 1 mol/L), vidi zadnji stavak točke 5.4. ovoga Dijela. pH vrijednost otopine treba biti približno 9,4.

3.8.1. Otopina bakrovog sulfata: u 100 mL vode otopi se 25 g bakrovog sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) koja je slobodna od željeza.

3.8.2. Otopina limunske kiseline: u 50 mL vode otopi se 50 g

limunske kiseline ($C_6H_8O_7 \cdot x H_2O$).

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

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

3.10. Otopina škroba: u litru proključale vode doda se smjesa 5 g topljivog škroba u 30 mL vode. Ostavi se ključati 3 minute, zatim se ohladi i po potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

3.11. Sulfatna kiselina, 3 mol/L

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

3.13. Plovuće u zrnu prokuhan u kloridnoj kiselini, ispran vodom i osušen

3.14. 3-metilbutan-1-ol

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. *Ekstrakcija uzorka*

Odvagne se 2,5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u odmjernu tikvicu volumena 250 mL. Doda se 200 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i 1 sat miješa u miješalici. Doda se 5 mL otopine Carrez I (točka 3.2. ovoga Dijela) i miješa približno 30 sekundi. Doda se 5 mL otopine Carrez II (točka 3.3. ovoga Dijela) i ponovo miješa 1 minutu. Dopuni se do oznake etanolom (točka 3.1. ovoga Dijela), homogenizira i fi ltrira. Uzme se 200 mL fi ltrata i otpari približno polovica kako bi se uklonila većina etanola. Toplom vodom se ostatak nakon otparavanja kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 200 mL, ohladi, dopuni vodom do oznake, homogenizira i po potrebi fi ltrira. Ta se otopina koristi za određivanje količine reducirajućih šećera, a nakon inverzije ukupnih šećera.

5.2. *Određivanje reducirajućih šećera*

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

5.3. *Određivanje ukupnih šećera nakon inverzije*

Pipetom se prenese 50 mL otopine u odmjernu tikvicu volumena 100 mL. Doda se nekoliko kapi otopine metiloranža (točka 3.4. ovoga Dijela), zatim se oprezno, uz stalno miješanje, dodaje kloridna kiselina (točka 3.5. ovoga Dijela) sve dok tekućina ne postane

potpuno crvena. Doda se 15 mL kloridne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela), tikvica se potopi u vodenu kupelj koja jako ključa i u njoj ostavi 30 minuta. Brzo se ohladi na približno 20 °C i doda 15 mL otopine natrijevog hidroksida (točka 3.7. ovoga Dijela). Dopuni se vodom do 100 mL i homogenizira. Prenese se najviše 25 mL otopine koja sadrži manje od 60 mg reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza. Po potrebi se dopuni destiliranom vodom do 25 mL i Luff - Schoorlovom metodom odredi udio reducirajućih šećera. Rezultat se iskazuje kao postotak glukoze ili, po potrebi, saharoze što se dobije množenjem s faktorom 0,95.

odmastiti sukladno točki 8.1. ovoga Dijela i ponovo odmastiti nakon kuhanja s kiselinom. Nakon kuhanja s kiselinom i naknadnog ispiranja, lončić se sa svojim sadržajem spoji na jedinicu za hladnu ekstrakciju (točka 4.6. ovoga Dijela) i triput ispere količinom od 30 mL acetona i triput količinom od 30 mL laganog petroleja. Filtrira se pod vakuumom do suhog i nastavlja analiza sukladno točki 5. ovoga Dijela, pri čemu se postupak započne dodavanjem kalijevog hidroksida.

8.3. Ako hrana za životinje sadrži više od 5% karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, lončić (točka 4.2. ovoga Dijela) s izvaganim uzorkom se spoji na grijaću jedinicu (točka 4.1. ovoga Dijela). Uzorak se triput ispere količinom od 30 mL kloridne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela). Nakon svakog dodavanja, uzorak se ostavi približno jednu minutu prije fi ltriranja. Ponovo se ispere s 30 mL vode i nastavi sukladno točki 5. ovoga Dijela.

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

8.5. Ako se kisele i bazične otopine nakon ključanja teško fi ltriraju, propuše se stlačeni zrak kroz ispusnu cijev grijaće jedinice i nastavi s fi ltriranjem.

8.6. Temperatura žarenja ne smije prijeći 500 °C kako bi se produljio vijek trajanja staklenih fi ltarskih lončića. Pri tome se mora voditi računa kako bi se spriječio pretjerani toplinski šok između ciklusa grijanja i hlađenja.

Dio J.

ODREĐIVANJE ŠEĆERA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje količine reducirajućih šećera i ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza

ili, ovisno o slučaju, saharoza s faktorom konverzije 0,95. Primjenjuje se za krmne smjese. Za drugu hranu za životinje primjenjuju se posebne metode. Po potrebi, laktoza se određuje odvojeno i uzima u obzir pri izračunu rezultata.

2. Načelo

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

3. Reagensi

3.1. Otopina etanola 40% (v/v) gustoće: 0,948 g/mL na 20 °C, neutralizirana prema fenolft aleinu

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

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

3.4. Metiloranž, otopina 0,1% (w/v)

3.5. Kloridna kiselina, 4 mol/L

3.6. Kloridna kiselina, 0,1 mol/L

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

3.8. Luff -Schoorlov reagens:

Uz oprezno miješanje, u otopinu natrijevog karbonata (točka

3.8.3. ovoga Dijela) ulije se otopina limunske kiseline (točka 3.8.2.

ovoga Dijela). Doda se otopina bakrovog sulfata (točka 3.8.1. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre. Ostavi se preko noći i fi ltrira.

STRANICA 24 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

8.3.1. Za približan izračun, udio se laktoze, određen drugom analitičkom metodom, pomnoži s 0,675, a dobiveni rezultat oduzme od udjela reducirajućih šećera.

8.3.2. Za točan izračun reducirajućih šećera, osim laktoze, mora se koristiti isti uzorak za dva konačna postupka određivanja. Jedna se analiza izvodi na dijelu otopine dobivene postupkom iz točke 5.1. ovoga Dijela, druga na dijelu otopine dobivene pri određivanju laktoze metodom utvrđenom za tu svrhu (nakon fermentiranja drugih vrsta šećera i bistrenja).

U oba se slučaja količina šećera određuje Luff -Schoorlovom metodom i izračunava u mg glukoze. Jedna se vrijednost oduzme

od druge i razlika iskazuje kao postotni udio uzorka.

Primjer:

Dva korištena volumena odgovaraju, za svaki postupak određivanja, uzorku od 250 mg.

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

Razlika je 16,6 mg glukoze.

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

Tablica vrijednosti za 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa

mL Na₂S₂O₃ 0,1 mol/L, 2 minute grijanja, 10 minuta ključanja

Na₂S₂O₃ Glukoza, fruktoza,

invertirani šećeri

C₆H₁₂O₆

Laktoza Maltoza Na₂S₂O₃

0,1 mol/L C₁₂H₂₂O₁₁ C₁₂H₂₂O₁₁ 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

5.4 Titracija prema Luff -Schoorlovoj metodi

Pipetom se prenese 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa (točka 3.8. ovoga Dijela) u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 300 mL; doda se točno 25 mL izbistrene otopine šećera. Doda se 2 zrnca plovuća (točka 3.13. ovoga Dijela), zagrijava nad otvorenim plamenom srednje jačine, uz ručno miješanje, tako da tekućina proključa za približno dvije minute. Erlenmeyerova se tikvica odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom s otvorom promjera 6 cm, ispod kojeg se upali plamen. Plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice. Na Erlenmeyerovu se tikvicu priključi povratno hladilo. Ostavi se ključati točno 10 minuta. Odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titrira na sljedeći način: Doda se 10 mL otopine kalijevog jodida (točka 3.12. ovoga Dijela) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenjenja) 25 mL sulfatne kiseline (točka 3.11. ovoga Dijela). Titrira se otopinom natrijevog tiosulfata (točka 3.9. ovoga Dijela) do pojave mutno žute boje, doda se indikator škrob (točka 3.10. ovoga Dijela) i dovrši titracija.

Jednaka se titracija izvede bez ključanja na točno izmjerenoj smjesi 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa (točka 3.8. ovoga Dijela) i 25 mL vode, nakon dodavanja 10 mL otopine kalijevog jodida (točka 3.12. ovoga Dijela) i 25 mL sulfatne kiseline (točka 3.11. ovoga Dijela).

6. Izračun rezultata

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

7. Posebni postupci

7.1. Kod hrane za životinje koja je bogata melasom i drugih vrsta hrane za životinje koje nisu osobito homogene, odvagane se 20 g uzorka i prenese s 500 mL vode u odmjernu tikvicu volumena 1 l. Miješa se 1 sat u rotacijskoj miješalici. Otopina se izbistri reagensima Carrez I (točka 3.2. ovoga Dijela) i II (točka 3.3. ovoga Dijela), sukladno točki 5.1. ovoga Dijela, ovaj put s četverostrukom količinom svakog reagensa. Volumen se dopuni 80% etanolom (v/v). Homogenizira se i filtrira. Etanol se ukloni sukladno točki 5.1. ovoga Dijela. Ako nije dostupan dekstrinirani škrob, volumen se dopuni destiliranom vodom.

7.2. Kod melasa i sirovina za životinjsku hranu bogatih šećerom i gotovo potpuno bez škroba (rogač, sušeni rezanci šećerne repe

itd.), odvagane se 5 g i prenese u odmjernu tikvicu volumena 250 mL, doda se 200 mL destilirane vode i miješa u rotacijskoj miješalici jedan sat ili po potrebi više. Otopina se izbistri reagensima Carrez I (točka 3.2. ovoga Dijela) i II (točka 3.3. ovoga Dijela), sukladno točki 5.1. ovoga Dijela. Volumen se dopuni, homogenizira i filtrira. Za određivanje količine ukupnih šećera nastavi se sukladno točki 5.3. ovoga Dijela.

8. Napomene

8.1. Za sprječavanje pjenjenja preporuča se prije ključanja s Luff -Schoorlovim reagensom dodati (bez obzira na obujam) približno 1 mL 3-metilbutan-1-ola (točka 3.14. ovoga Dijela).

8.2. Razlika između udjela ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza, i udjela reducirajućih šećera, iskazanih kao glukoza, pomnoženo s 0,95, daje postotni udio saharoze.

8.3. Za određivanje udjela reducirajućih šećera, osim laktoze, mogu se koristiti dvije metode:

Na isti se način izvodi slijepa proba s 5 mL suspenzije kvasca (točka 3.1. ovoga Dijela). Udio laktoze se određuje Luff -Schoorlovom metodom na sljedeći način: doda se točno 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa (točka 3.4. ovoga Dijela) i 2 zrna plovućca (točka 3.5. ovoga Dijela). Uz ručno miješanje zagrijava se iznad otvorenog plamena srednje jakosti tako da tekućina proključa za približno dvije 2 minute. Erlenmeyerova se tikvica odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom s otvorom promjera 6 cm, ispod kojeg se upali plamen. Plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice. Na Erlenmeyerovu se tikvicu priključi povratno hladilo. Ostavi se ključati točno 10 minuta. Odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titrira na sljedeći način: Doda se 10 mL otopine kalijevog jodida (točka 3.6. ovoga Dijela) i odmah nakon toga (oprezno, zbog opasnosti od snažnog pjenjenja) 25 mL sulfatne kiseline (točka 3.7. ovoga Dijela). Titrira se otopinom natrijevog tiosulfata (točka 3.8. ovoga Dijela) do pojave mutno žute boje, doda se indikator škrob (točka 3.9.) i dovrši titracija. Jednaka se titracija izvede bez ključanja na točno izmjerenoj smjesi 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa (točka 3.4. ovoga Dijela) i 25 mL vode, nakon dodavanja 10 mL otopine kalijevog jodida (točka

3.6. ovoga Dijela) i 25 mL sulfatne kiseline (točka 3.7. ovoga Dijela).

6. Izračun rezultata

Iz tablice se odredi količina laktoze u mg koja odgovara razlici između vrijednosti dvije titracije, iskazanim u mL natrijevog tiosulfata 0,1 mol/L.

Rezultat se iskazuje kao postotak udjela bezvodne laktoze u uzorku.

7. Napomena

Za proizvode koji sadrže više od 40% fermentiranog šećera koristi se više od 5 mL suspenzije kvasca (točka 3.1. ovoga Dijela).

Tablica vrijednosti za 25 mL Luff -Schoorlovog reagensa

mL Na₂S₂O₃ 0,1 mol/L, 2 minute grijanja, 10 minuta ključanja

Na₂S₂O₃ Glukoza, fruktoza,
invertirani šećeri

C₆H₁₂O₆

Laktoza Maltoza Na₂S₂O₃

0,1 mol/L C₁₂H₂₂O₁₁ C₁₂H₂₂O₁₁ 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

Dio K.

ODREĐIVANJE LAKTOZE

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine laktoze u

hrani za životinje koja sadrži više od 0,5% laktoze.

2. Načelo

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

3. Reagensi

3.1. Suspenzija kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*: otopi se 25 g svježeg kvasca u 100 mL vode. Suspenzija se uz držanje u hladnjaku može koristiti na rok ne duži od jedan tjedan.

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

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

3.4. Luff -Schoorlov reagens:

Uz oprezno miješanje, u otopinu natrijevog karbonata (točka

3.4.3. ovoga Dijela) ulije se otopina limunske kiseline (točka 3.4.2. ovoga Dijela). Doda se otopina bakrovog sulfata (točka 3.4.1. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre. Ostavi se preko noći i fi ltrira. Provjeri se koncentracija tako dobivenog reagensa (Cu 0,05 mol/L, Na_2CO_3 1 mol/L). pH vrijednost otopine je približno 9,4.

3.4.1. Otopina bakrovog sulfata: u 100 mL vode otopi se 25 g bakrovog sulfata ($CuSO_4 \times 5H_2O$) koja je slobodna od željeza.

3.4.2. Otopina limunske kiseline: u 50 mL vode otopi se 50 g limunske kiseline ($C_6H_8O_7 \times H_2O$).

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

3.5. Plovućac u zrnu, ispran u kloridnoj kiselini i osušen.

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

3.7. Sulfatna kiselina, 3 mol/L

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

3.9. Otopina škroba: u litru vrele vode doda se smjesa 5 g topljivog škroba u 30 mL vode. Ostavi se ključati 3 minute, zatim se ohladi i po potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.

4. Oprema

Vodena kupelj s termostatom postavljenim na 38 – 40 °C

5. Postupak

Odvagne se 1 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u odmjernu

tikvicu volumena 100 mL. Doda se 25 – 30 mL vode. Tikvica se stavi u proključalu vodenu kupelj i u njoj ostavi 30 minuta, zatim se ohladi na približno 35 °C. Doda se 5 mL suspenzije kvasca (točka 3.1. ovoga Dijela) i homogenizira. Tikvica se ostavi 2 sata u vodenoj kupelji na temperaturi 38 – 40 °C. Ohladi se na približno 20 °C. Doda se 2,5 mL otopine Carrez I (točka 3.2. ovoga Dijela) i miješa 30 sekundi, zatim 2,5 mL otopine Carrez II (točka 3.3. ovoga Dijela) i ponovo miješa 30 sekundi. Dopuni se vodom do 100 mL, promiješa i fi ltrira. Dio fi ltrata ne veći od 25 mL, koji poželjno sadrži 40 do 80 mg laktoze, pipetom se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 300 mL. Po potrebi se dopuni vodom do 25 mL.

STRANICA 26 – BROJ 146 PONEĐJELJAK, 27. PROSINCA 2010. **NARODNE**
NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HRVA TSKE

testni uzorak ravnomjerno raspodijeli i doda još 25 mL kloridne kiseline (točka 3.2. ovoga Dijela). Tikvica se stavi u proključalu vodenu kupelj i prve 3 minute jako i ravnomjerno mućka kako bi se spriječilo nastajanje aglomerata. U vodenoj kupelji mora biti toliko vode da kada se u nju stavi tikvica kupelj ostane na točki ključanja. Tikvica se tijekom mućkanja ne smije vaditi iz kupelji. Nakon točno 15 minuta, tikvica se izvadi iz kupelji, doda se 30 mL hladne vode i odmah ohladi na 20 °C.

Doda se 5 mL otopine Carrez I (točka 3.3. ovoga Dijela) i mućka približno 30 sekundi. Zatim se doda 5 mL otopine Carrez II (točka 3.4. ovoga Dijela) i ponovo mućka 30 sekundi. Volumen se dopuni vodom, promiješa i fi ltrira. Ako fi ltrat nije potpuno bistar (što se rijetko događa), ponovi se postupak određivanja uz korištenje veće količine otopina Carrez I i II, na primjer 10 mL.

Polarimetrom ili saharimetrom se izmjeri optička rotacija otopine u epruveti volumena 200 mL.

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

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg, prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL i doda približno 80 mL etanola (točka 3.5. ovoga Dijela) (vidi napomenu pod točkom 7.2. ovoga Dijela). Tikvica se ostavi 1 sat na sobnoj temperaturi; u tom se vremenskom razdoblju šest puta snažno promućka kako bi se testni uzorak temeljito promiješao s etanolom. Volumen se dopuni etanolom (točka 3.5. ovoga Dijela), promiješa i fi ltrira.

Pipetom se prenese 50 mL fi ltrata (što odgovara 2,5 g uzorka) u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 mL, doda se 2,1 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela) i jako promućka. Povratno hladilo se priključi na Erlenmeyerovu tikvicu i stavi u proključalu vodenu kupelj. Nakon točno 15 minuta, Erlenmeyerova se tikvica izvadi iz kupelji, a njezin sadržaj prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL, ispere s malo hladne vode i ohladi na 20 °C.

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

6. Izračun rezultata

Udio škroba (%) izračunava se na sljedeći način:

6.1. Mjerenje polarimetrom

Udio škroba (%) =

P = ukupna optička rotacija u kutnim stupnjevima;

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

= specifi čna optička rotacija čistog škroba. Brojčane vrijednosti koje se smatraju uobičajeno prihvaćenima su:

+185,9°: rižin škrob;

+185,7°: krumpirov škrob;

+184,6°: kukuruzni škrob;

+182,7°: pšenični škrob;

+181,5°: ječmeni škrob;

+181,3°: zobeni škrob;

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

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 L.

ODREĐIVANJE ŠKROBA

POLARIMETRIJSKA METODA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine škroba i visokomolekularnih produkata razgradnje škroba u hrani za životinje za provjeru usklađenosti s deklariranom energetsom vrijednošću (odredbe iz Priloga VII. ovoga Pravilnika) i Pravilnik o stavljanju

na tržište i korištenju hrane za životinje (» Narodne novine «, broj 156/09).⁴

2. Načelo

Metoda obuhvaća dva postupka određivanja. U prvom se postupku uzorak obradi razrijeđenom kloridnom kiselinom. Nakon bistrenja i filtriranja, polarimetrijom se izmjeri optička rotacija otopine. U drugom se postupku uzorak ekstrahira s 40% etanolom. Nakon kiseljenja filtrata kloridnom kiselinom, bistrenja i filtriranja, izmjeri se optička rotacija na isti način kao u prvom postupku određivanja.

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

3. Reagensi

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

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

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

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

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

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

4. Oprema

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

4.2. Polarimetar ili saharmetar

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

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

5.2. *Određivanje ukupne optičke rotacije (P ili S)* (vidi napomenu pod točkom 7.1. ovoga Dijela)

Odvagne se 2,5 g usitnjenog uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL. Doda se 25 mL kloridne kiseline (točka 3.2. ovoga Dijela), promućka tako da se

2. Načelo

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

3. Reagensi

Amonijev nitrat, 20% otopina (w/v)

4. Oprema

4.1. Grijaća ploča

4.2. Električna mufolna peć s termostatom

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

5. Postupak

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

5.1. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. Ostavi se na toj temperaturi sve do nastanka bijelog, svijetlo sivog ili crvenkastog pepela koji izgleda kao da ne sadrži ugljične čestice. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se ohladiti i odmah izvaže.

5.2. Lončić se postavi u umjerenu mufolnu peć zagrijanu na 550 °C. U peći se spaljuje 3 sata. Lončić se postavi u eksikator, ostavi se ohladiti i odmah izvaže. Ponovo se 30 minuta spaljuje kako bi se osiguralo da je masa pepela konstantna (gubitak mase između dva uzastopna vaganja mora biti manji ili jednak 1 mg).

6. Izračun rezultata

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

7. Napomene

7.1. Tvari koje se teško spaljuju moraju se izložiti prvom spaljivanju u trajanju od najmanje tri sata, zatim se ohlade i dodaje im se nekoliko kapi 20% otopine amonijevog nitrata ili vode (oprezno, kako bi se spriječilo raspršivanje pepela ili nastanak gruda). Nakon sušenja u sušioniku nastavi se sa spaljivanjem. Postupak se po potrebi ponovi, sve do potpunog spaljivanja.

7.2. Kod tvari koje su otporne na obradu iz točke 7.1. ovoga Dijela,

postupa se na sljedeći način: nakon trosatnog spaljivanja, pepeo se prenese u toplu vodu i filtrira kroz mali filter slobodan od pepela. Filter i njegov sadržaj se spale u istom lončiću. Filtrat se prenese u ohlađen lončić, otpari do suhog, spali i izvaže.

7.3. Kod ulja i masti, točno se izvaže 25 g u lončić prikladne veličine. Karbonizira se tako da se tvar zapali vrpcom od filter papira slobodnog od pepela. Nakon spaljivanja navlaži se što je moguće manjom količinom vode. Osuši se i spali sukladno točki 5. ovoga Dijela.

Dio N.

ODREĐIVANJE PEPELA, NETOPLJIVOG U KLORIDNOJ KISELINI

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine mineralnih tvari netopljivih u kloridnoj kiselini u hrani za životinje. Uzimajući u obzir prirodu uzorka mogu se primijeniti dvije metode.

6.2. *Mjerenje saharimetrom*

Udio škroba (%) =

S = ukupna optička rotacija u stupnjevima saharimetra;

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

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

16,29 g za francuske saharimetre;

26,00 g za njemačke saharimetre;

20,00 g za kombinirane saharimetre;

= specifična optička rotacija čistog škroba (vidi točku

6.1. ovoga Dijela).

6.3. *Ponovljivost*

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

7. Napomene

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

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

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

- proizvodi iz šećerne repe poput suhih rezanaca šećerne repe, melase šećerne repe, melasiranih rezanaca šećerne repe, vinase šećerne repe, šećera od šećerne repe,
- pulpa citrusa,
- sjemenke lana; pogača od lanenih sjemenki; sačma od lanenih sjemenki,
- sjemenke uljane repice; pogača uljane repice; sačma uljane repice; ljuske uljane repice,
- sjemenke suncokreta; sačma od sjemenki suncokreta; sačma od djelomično oljuštenih sjemenki suncokreta,
- pogača kokosa, sačma kokosa (kopre),
- pulpa krumpira,
- suhi kvasac,
- proizvodi s visokim udjelom inulina (npr. kriške i brašno od čičoke lat. *Heliathus tuberosus*),
- čvarci.

Dio M.

ODREĐIVANJE SIROVOG PEPELA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje udjela sirovog pepela u hrani za životinje.

STRANICA 28 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE
NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

ispere toplom otopinom 1% trikloroctene kiseline (točka 3.3. ovoga Dijela).

Dio O.

ODREĐIVANJE KARBONATA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje količine karbonata u većini hrane za životinje koji se uobičajeno iskazuju kao kalcijev karbonat.

Međutim, u nekim se slučajevima (na primjer, kod željezo karbonata) treba primijeniti posebna metoda.

2. Načelo

Karbonati se razlažu kloridnom kiselinom; oslobođeni se ugljikov dioksid prikupi u graduiranu cijev, a njegov volumen usporedi s volumenom koji se pod istim uvjetima oslobađa iz poznate količine kalcijevog karbonata.

3. Reagensi

3.1. Kloridna kiselina, gustoća 1,10 g/mL

3.2. Kalcijev karbonat

3.3. Sulfatna kiselina, približno 0,05 mol/L, obojana metilnim crvenilom

4. Oprema

Scheibler-Dietrichova naprava (vidi sliku 2.) ili druga ekvivalentna naprava

5. Postupak

S obzirom na udio karbonata u uzorku odvagane se dio uzorka, kako se navodi dalje u tekstu:

- 0,5 g kod proizvoda koji sadrže 50 – 100% karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat,
- 1 g kod proizvoda koji sadrže 40 – 50% karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat,
- 2 do 3 g za druge proizvode.

Odvagnuti se dio uzorka prenese u posebnu tikvicu (dio 4. slike 2.) naprave, opremljenu malom epruvetom od neslomljivog materijala u kojoj se nalazi 10 mL kloridne kiseline (3.1.) te se tikvica spoji s napravom. Troputni se ventil (dio 5. slike 2.) okrene tako da je cijev (dio 1. slike 2.) otvorena prema van. Pomičnom cijevi (dio 2. slike 2.), napunjenom obojanom sulfatnom kiselinom (točka 3.3. ovoga Dijela) i povezanom s graduiranom cijevi (dio 1. slike 2.), razina tekućine dovede se do oznake nula. Ventil (dio 5. slike 2.) se okrene tako da se spoje cijev (dio 1. slike 2.) i cijev (dio 3. slike 2.), zatim se provjeri je li razina na oznaci nula.

Naginjanjem tikvice (dio 4. slike 2) kloridna se kiselina (točka 3.1. ovoga Dijela) polako prelijeva preko uzorka. Tlak se izjednači spuštanjem cijevi (dio 2. slike 2.). Tikvica (dio 4. slike 2.) se mućka

sve dok potpuno ne prestane oslobađanje ugljikovog dioksida. Ponovo se uspostavi tlak vraćanjem razine tekućina u cijevi (dio 1. slike 2.) i cijevi (dio 2. slike 2.) na istu razinu. Rezultat se očita nakon *nekoliko minuta* kada se ustali obujam plina.

U istim se uvjetima izvede kontrolni pokus s 0,5 g kalcijevog karbonata (točka 3.2. ovoga Dijela).

6. Izračun rezultata

Udio karbonata, iskazanih kao kalcijev karbonat, izračunava se sljedećom formulom:

1.1. Metoda A: primjenjuje se za krmiva organskog podrijetla i većinu krmnih smjesa;

1.2. Metoda B: primjenjuje se za mineralna krmiva, mineralne mješavine i za krmne smjese koje, prema metodi A, sadrže više od 1% tvari netopljivih u kloridnoj kiselini.

2. Načelo

2.1. Metoda A: uzorak se spali, pepeo se kuha u kloridnoj kiselini, a netopljivi ostatak se fi ltrira i izvaže.

2.2. Metoda B: uzorak se obradi kloridnom kiselinom. Otopina se fi ltrira, ostatak spali, a tako dobiveni pepeo obradi sukladno metodi A.

3. Reagensi

3.1. Kloridna kiselina, 3 mol/L

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

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

4. Oprema

4.1. Grijaća ploča

4.2. Električna mufolna peć s termostatom

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

5. Postupak

5.1. Metoda A

Uzorak se spali sukladno metodi za određivanje sirovog pepela.

Može se koristiti i pepeo dobiven tijekom navedene analize.

Pepeo se prenese u čašu volumena 250 mL do 400 mL sa 75 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela). Polako se zagrije do ključanja i petnaest minuta ostavi lagano ključati. Topla otopina se fi ltrira kroz papir za fi ltriranje slobodan od pepela, ostatak se ispire toplom vodom sve do prestanka kisele reakcije. Filtar s ostatkom i pepelom se osuši u tariranom lončiću za spaljivanje na 550 – 700 °C.

Ohladi se u eksikatoru i izvaže.

5.2. Metoda B

Odvagne se 5 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u čašu volumena 250 mL do 400 mL. Doda se 25 mL vode, zatim 25 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela), promiješa i pričekava da se reakcija umiri. Doda se još 50 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela). Pričekava se dok potpuno ne prestane ispuštanje plina, zatim se čaša stavi u proključalu vodenu kupelj i tamo drži 30 minuta ili po potrebi dulje kako bi se potpuno hidrolizirao sav eventualno prisutni škrob. Filtrira se dok je topao kroz fi ltar slobodan od pepela, a fi ltar ispere s 50 mL tople vode (vidi napomenu pod točkom 7. ovoga Dijela). Filtar koji sadrži ostatak prenese se u lončić za spaljivanje, osuši i spali na 550 – 700 °C. Pepeo se prenese u čašu volumena 250 mL do 400 mL sa 75 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela); nastavi se kako je opisano u drugom podstavku točke 5.1. ovoga Dijela.

6. Izračun rezultata

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

7. Napomena

Ako pri fi ltriranju nastupe poteškoće, analiza se ponovi, pri čemu se 50 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela) zamijeni s 50 mL 20% trikloroctene kiseline (točka 3.2. ovoga Dijela), a fi ltar

zvoda s niskim udjelom fosfora. U nekim se slučajevima (kod proizvoda bogatih fosforom) može primijeniti i gravimetrijska metoda.

2. Načelo

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

3. Reagensi

3.1. Kalcijev karbonat

3.2. Kloridna kiselina, $\rho_{20} = 1,10$ g/mL (približno 6 mol/L)

3.3. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,045$ g/mL

3.4. Dušična kiselina, $\rho_{20} = 1,38$ do 1,42 g/mL

3.5. Sulfatna kiselina, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/mL}$

3.6. Molibdovanadatni reagens: u graduiranoj tikvici volumena

1L pomiješa se 200 mL otopine amonijevog heptamolibdata (točka

3.6.1. ovoga Dijela), 200 mL otopine amonijevog monovanadata

(točka 3.6.2. ovoga Dijela) i 134 mL dušične kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela). Dopuni se vodom do oznake.

3.6.1. Otopina amonijevog heptamolibdata: u vrućoj se vodi

otopi 100 g amonijevog heptamolibdata $((\text{NH}_4)_6 \times \text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O})$.

Doda se 10 mL amonijaka (gustoća 0,91 g/mL) i dopuni vodom do 1 litre.

3.6.2. Otopina amonijevog monovanadata: u 400 mL vruće vode

otopi se 2,35 g amonijevog monovanadata (NH_4VO_3) . Uz stalno miješanje polako se dodaje 20 mL razrijeđene dušične kiseline (7 mL

HNO_3 (3.4) + 13 mL H_2O) i dopuni vodom do 1 litre.

3.7. Standardna otopina 1 mg fosfora na mL: u vodi se otopi

4,387 g kalijevog dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) . Dopuni se vodom do 1 litre.

4. Oprema

4.1. Lončići za spaljivanje iz kvarcnog stakla, porculana ili platine

4.2. Električna mufolna peć s termostatom postavljenim na 550°C

4.3. Kjeldahlova tikvica volumena 250 mL

4.4. Graduirane tikvice i precizne pipete

4.5. Spektrofotometar

4.6. Epruvete promjera približno 16 mm, s brušenim čepovima promjera 14,5 mm, volumena 25 – 30 mL

5. Postupak

5.1. *Priprema otopine*

Uzimajući u obzir prirodu uzorka, otopina se pripravlja sukladno točki 5.1.1. ili 5.1.2. ovoga Dijela.

5.1.1. *Standardni postupak*

Odvagne se 1 g uzorka ili više s preciznošću od 1 mg. Uzorak

se prenese u Kjeldahlovu tikvicu, doda se 20 mL sulfatne kiseline

(točka 3.5. ovoga Dijela) i promućka kako bi se uzorak u potpunosti natopio kiselinom i spriječilo njegovo prijanjanje na stjenke tikvice,

zatim se zagrije i ostavi ključati 10 minuta. Ostavi se ohladiti, doda

se 2 mL dušične kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela), lagano se zagrije,

malo se ohladi, doda se još malo dušične kiseline (točka 3.4. ovoga

Dijela) i ponovo zagrije do ključanja. Postupak se ponavlja sve dok

se ne dobije bezbojna otopina. Ohladi se, doda malo vode, tekućina

se odlije u graduiranu tikvicu volumena 500 mL, a Kjeldahlova pri čemu je:

$X = \%$ (w/w) karbonata u uzorku, iskazanih kao kalcijev karbonat;

V = mL oslobođenog CO_2 iz dijela uzorka;

V_1 = mL oslobođenog CO_2 iz 0,5 g CaCO_3 ;

m = masa dijela uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kada je masa dijela uzorka veća od 2 g, prvo se u tikvicu (dio 4. slike 2.) ulije 15 mL destilirane vode i promiješa prije početka pokusa. Za kontrolni se pokus koristi jednaka količina vode.

7.2. Ako korištena aparatura ima različiti volumen u odnosu na Scheibler-Dietrichovu aparaturu, potrebno je na primjeren način prilagoditi količinu dijelova uzorka i kontrolne tvari i izračun rezultata.

Slika 2.

Scheiber-Dietrichova aparatura za određivanje CO_2
(mjere u mm)

Dio P.

ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA

FOTOMETRIJSKA METODA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje ukupnog udjela fosfora u hrani za životinje. Osobito je primjerena za analizu proiSTRANICA

30 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. **NARODNE**
NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

kiselinom, a kloridi istalože otopinom srebrnog nitrata u obliku srebrnog klorida. Višak srebrnog nitrata titrira se otopinom amonijevog tiocijanata po Volhardovoj metodi.

3. Reagensi

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

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

3.3. Zasićena otopina amonijevog željeznog sulfata (NH_4)
 $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

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

3.5. Dietil eter

3.6. Aceton

3.7. Otopina Carrez I: u vodi se otopi 21,9 g cinkovog acetata

$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g ledene octene kiseline. Dopuni se vodom do 100 mL.

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

3.9. Aktivni ugljen koji ne sadrži kloride niti ih apsorbira.

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. *Priprema otopine*

Uzimajući u obzir prirodu uzorka, otopina se pripravlja kako je navedeno u točkama 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3. ovoga Dijela.

Istovremeno se izvodi slijepa proba bez uzorka koji se analizira.

5.1.1. *Uzorci bez organskih tvari*

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

5.1.2. *Uzorci koji sadrže organske tvari, osim proizvoda iz točke 5.1.3. ovoga Dijela*

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

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

Otopina se pripravi sukladno točki 5.1.2. ovoga Dijela, ali se ne fi ltrira. Dekantira se (po potrebi centrifugira), uzme se 100 mL supernatanta i prenese u tikvicu volumena 200 mL. Pomiješa se s acetonom (točka 3.6. ovoga Dijela) i s tim se otapalom volumen dopuni, homogenizira i fi ltrira.

5.2. *Titracija*

Pipetom se u Erlenmeyerovu tikvicu prenese 25 – 100 mL fi ltrata (uzimajući u obzir pretpostavljeni udio klora) dobivenog postupkom iz točke 5.1.1., 5.1.2. ili 5.1.3. ovoga Dijela. Alikvotni dio ne smije sadržavati više od 150 mg klora (Cl). Po potrebi se razrijedi vodom na najmanje 50 mL, doda se 5 mL dušične kiseline (točka

3.4. ovoga Dijela), 20 mL zasićene otopine amonijevog željeznog sulfata (točka 3.3. ovoga Dijela) i 2 kapi otopine amonijevog tiocijanata (točka 3.1. ovoga Dijela), koji se prenese iz birete napunjene tikvica se ispere vrućom vodom. Ostavi se ohladiti, dopuni vodom do oznake, homogenizira i fi ltrira.

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

Odvagne se i prenese u lončić za spaljivanje 2,5 g uzorka s preciznošću od 1 mg. Doda se 1 g kalcijevog karbonata (točka 3.1. ovoga Dijela) i miješa sa testnim uzorkom dok se u potpunosti ne izmiješaju. Spaljuje se u peći pri 550 °C do nastanka bijelog ili sivog pepela (malena količina ugljena ne predstavlja problem). Pepeo se prenese u čašu volumena 250 mL. Doda se 20 mL vode i kloridna kiselina (točka 3.2. ovoga Dijela) sve dok ne prestane pjenjenje. Doda se još 10 mL kloridne kiseline (točka 3.2. ovoga Dijela). Čaša se stavi u pješčanu kupelj i ostavi ispariti do suhog, da kvarcni pijesak postane netopljiv. Ostatak se ponovo otopi u 10 mL dušične kiseline (točka 3.3. ovoga Dijela) i ostavi ključati 5 minuta u pješčanoj kupelji ili na grijaćoj ploči, ali se ne smije potpuno ispariti. Tekućina se odlije u graduiranu tikvicu volumena 500 mL, čaša se više puta ispere vrućom vodom. Ostavi se ohladiti, dopuni vodom do oznake, homogenizira i fi ltrira.

5.2. Nastanak obojenja i mjerenje optičke gustoće

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

5.3. Kalibracijska krivulja

Iz standardne otopine (točka 3.7. ovoga Dijela) pripreme se otopine koje sadrže 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosfora na mL. Uzme se 10 mL od svake navedene otopine i doda 10 mL molibdovanadatnog reagensa (točka 3.6. ovoga Dijela). Homogenizira se i ostavi najmanje 10 minuta na 20 °C. Izmjeri se optička gustoća sukladno točki 5.2. ovoga Dijela. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće za odgovarajuće količine fosfora. Za koncentracije u području od 0 – 40 µg/mL krivulja je linearna.

6. Izračun rezultata

Količina fosfora u testnom uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje.

Rezultat se iskazuje kao postotni udio uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 3% u odnosu na najviši rezultat, ako je udio fosfora niži od 5%,
- 0,15% apsolutne vrijednosti, ako je udio fosfora 5% ili više.

Dio Q.

ODREĐIVANJE KLORA IZ KLORIDA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje količine klora u kloridima topljivim u vodi koji se uobičajeno iskazuju kao natrijev klorid. Primjenjuje se za svu hranu za životinje.

2. Načelo

Kloridi se otope u vodi. Ako proizvod sadrži organske tvari, koristi se postupak bistrjenja. Otopina se lagano zakiseli dušičnom

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 31

NARODNE
NOVINE SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

3.3. Metanol

3.4. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 mL}$

3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 mL}$ (vidi napomenu pod točkom 7.7. ovoga Dijela)

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

3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/L}$ u glicerolu, $s = 120 \text{ g/L}$ (za $X = 9$) (vidi napomenu pod točkom 7.8. ovoga Dijela)

3.7. Otopina fenolftaleina, $c = 2 \text{ g/100 mL}$ u etanolu (točka 3.1. ovoga Dijela)

3.8. 2-propanol

3.9. HPLC mobilna faza: smjesa metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) i vode, npr. $980 + 20 (v + v)$. Točan se omjer određuje sukladno osobinama korištene kolone.

3.10. Dušik, bez kisika

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

3.11.1. Osnovna otopina trans-vitamin A acetata: odvagane se 50 mg acetata vitamina A (točka 3.11. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8. ovoga Dijela) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija te otopine iznosi 1400 IU vitamina A na mL. Točan se udio određuje sukladno točki 5.6.3.1. ovoga Dijela.

3.12. Trans-vitamin A palmitat, posebne čistoće, certifi cirane aktivnosti, npr. $1,80 \times 10^6$ IU/g

3.12.1. Osnovna otopina trans-vitamin A palmitata: odvagane se 80 mg vitamina A palmitata (točka 3.12. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL. Otopi se u 2-propanolu (točka 3.8. ovoga Dijela) i dopuni istim otapalom do oznake. Nominalna koncentracija te otopine iznosi 1400 IU vitamina A na mL. Točan se udio određuje sukladno točki 5.6.3.2. ovoga Dijela.

3.13 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (vidi napomenu pod točkom 7.5. ovoga Dijela)

4. Oprema

4.1. Rotacioni vakuum otparivač

4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla

4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, volumena 500 mL, s brušenim vratom

4.2.2. Graduirske tikvice s čepovima od brušenog stakla, s uskim vratom, volumena 10, 25, 100 i 500 mL

4.2.3. Lijeenci za odjeljivanje, konusni, 1000 mL, s čepovima od brušenog stakla

4.2.4. Kruškaste tikvice, 250 mL, s čepovima od brušenog stakla

4.3. Allihnov kondenzator, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina

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

4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje

4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili ekvivalentna (mjerilo učinkovitosti: samo jedan pik za sve izomere retinola u uvjetima za HPLC)

4.5.2. UV ili fluorescentni detektor s mogućnošću promjene valne duljine

4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kvjetama od 10 mm

do nulte oznake. Biretom se prenese otopina srebrnog nitrata (točka 3.2. ovoga Dijela) tako da nastane 5 mL viška. Doda se 5 mL dietil etera (točka 3.5. ovoga Dijela) i dobro promućka tako da se talog zgruša. Višak srebrnog nitrata titrira se otopinom amonijevog tiocijanata (točka 3.1. ovoga Dijela) sve dok crvenkasto-smeđe obojenje ne potraje 1 minutu.

6. Izračun rezultata

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

pri čemu je:

V_1 = mL dodane otopine srebrnog nitrata 0,1 mol/L;

V_2 = mL otopine amonijevog tiocijanata 0,1 mol/L korištene za titraciju;

m = masa uzorka.

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

7. Napomene

7.1. Titracija se može izvršiti i potencijometrijskom titracijom.

7.2. Proizvodi bogati uljima i mastima prvo se odmaste dietil eterom ili laganim petrolejem.

7.3. Kod ribljeg brašna, titracija se može izvršiti Mohrovom metodom.

PRILOG IV.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU KOLIČINE ODOBRENIH DODATAKA HRANI ZA ŽIVOTINJE DIO A.

ODREĐIVANJE VITAMINA A

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje sadržaja vitamina A (retinola) u hrani za životinje i premiksima. Vitamin A uključuje trans-retinil alkohol i njegove cis izomere koji se određuju ovom metodom. Udio vitamina A iskazuje 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 transvitamin A palmitata.

Granica kvantifikacije je 2000 IU vitamina A/kg.

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijevog hidroksida, a vitamin A se ekstrahira laganim petrolejem. Otapalo se ukloni

otparavanjem, a ostatak otopi u metanolu i po potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina A se određuje visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom reverznih faza (RP–HPLC) s UV ili fl uorescencijskim detektorom. Odaberu se oni kromatografski parametri koji omogućuju da se trans-vitamin A alkohol i njegovi cis izomeri ne razdvoje.

3. Reagensi

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

3.2. Laganí petrolej, vrelište 40 – 60 °C

STRANICA 32 – BROJ 146 PONEĐJELJAK, 27. PROSINCA 2010. **NARODNE** **NOVINE** SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

četiri ispiranja). Isprani se ekstrakt fi ltrira kroz suhi nabrani fi ltar za razdvajanje faza (točka 4.4. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 500 mL (točka 4.2.2. ovoga Dijela) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odjeljivanje i fi ltar se isperu s 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), dopuni se laganim petrolejem do oznake (točka 3.2. ovoga Dijela) i dobro promiješa.

5.3.2. *Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela)*

Kada se slojevi odijele (vidi napomenu pod točkom 7.3. ovoga Dijela), slavina staklenog valjka (točka 4.8.1. ovoga Dijela) se zamijeni s uloškom od brušenog stakla (točka 4.8.2. ovoga Dijela), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi se odmah iznad razine veznog sklopa. Tlakom koji tvori dušik u bočnoj ručici gornji se sloj laganog petroleja prenese u lijevke za odjeljivanje volumena 1000 mL (točka 4.2.3. ovoga Dijela). U stakleni se valjak doda 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), začepi i dobro promućka. Pričeka se do razdvajanja slojeva, a gornji se sloj prenese u lijevak za odjeljivanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), zatim dvaput s količinom od 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), a slojevi laganog petroleja dodaju u lijevak za odjeljivanje.

Spojeni se ekstrakti laganog petroleja isperu, sukladno točki

5.3.1 ovoga Dijela, zatim se nastavi sukladno navedenoj točki.

5.4. *Priprema otopine uzorka za HPLC*

Alikvotni dio otopine laganog petroleja (iz točke 5.3.1. ili 5.3.2. ovoga Dijela) prenese se pipetom u kruškoliku tikvicu volumena 250 mL (točka 4.2.4. ovoga Dijela). Otapalo se otpari skoro do suhog u

rotacionom otparivaču (točka 4.1. ovoga Dijela) pri sniženom tlaku i temperaturi kupelji do 40 °C. Dovođenjem dušika uspostavi se atmosferski tlak (točka 3.10. ovoga Dijela), a tikvica se izvadi iz rotacionog otparivača. Preostalo se otapalo otpari u struji dušika (točka 3.10. ovoga Dijela), a ostatak odmah otopi u poznatom volumenu (10 – 100 mL) metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) (koncentracija vitamina A mora biti 5 – 30 IU/mL).

5.5. HPLC određivanje

Vitamin A se razdvaja na koloni C18 s reverznim fazama (točka 4.5.1. ovoga Dijela), koncentracija se izmjeri UV detektorom (325 nm) ili fl uorescentnim detektorom (ekscitacija: 325 nm, emisija: 475 nm) (točka 4.5.2. ovoga Dijela).

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

Uvjeti za HPLC

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.5.1. ovoga Dijela): 250 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili ekvivalentna

Mobilna faza

(točka 3.9. ovoga Dijela): Smjesa metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) i vode, npr. 980 + 20 (v + v)

Brzina protoka: 1 – 2 mL/min

Detektor

(točka 4.5.2. ovoga Dijela): UV detektor (325 nm) ili fl uorescentni detektor (ekscitacija: 325 nm/emisija: 475 nm)

4.7. Vodena kupelj s magnetnom miješalicom

4.8. Naprava za ekstrakciju (vidi sliku 3.) koja se sastoji od:

4.8.1. Staklenog valjka volumena 1 litra s vratom od brušenog stakla i čepom;

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

5. Postupak

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

5.1. Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine očice 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje topline. Mljevenje se mora izvršiti neposredno prije vaganja i saponifi kacije, inače može doći do gubitka vitamina A.

5.2. Saponifi kacija

Ovisno o sadržaju vitamina A, odvagane se 2 – 25 g uzorka s preciznošću od 1 mg i prenese u tikvicu s ravnim dnom ili konusnu tikvicu volumena 500 mL (točka 4.2.1. ovoga Dijela). Uz stalno vrtloženje, jedno za drugim dodaje se 130 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela), približno 100 mg BHT (točka 3.13. ovoga Dijela), 2 mL otopine natrijevog askorbata (točka 3.5. ovoga Dijela) i 2 mL otopine natrijevog sulfida (točka 3.6. ovoga Dijela). Na tikvicu se priključi kondenzator (točka 4.3. ovoga Dijela) i tikvica se stavi u vodenu kupelj s magnetnom miješalicom (točka 4.7. ovoga Dijela). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi ključati uz refl uks. Zatim se kroz kondenzator doda 25 mL otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4. ovoga Dijela) i ostavi ključati uz refl uks (točka 4.3. ovoga Dijela) sljedećih 25 minuta, uz miješanje pod laganom strujom dušika. Zatim se kondenzator ispere s približno 20 mL vode, a sadržaj tikvice ohladi na sobnu temperaturu.

5.3. Ekstrakcija

Otopina za saponifi kaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odjeljivanje volumena 1000 mL (točka 4.2.3. ovoga Dijela) ili u napravu za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela), tako što se ispere s ukupno 250 mL vode. Zatim se tikvica za saponifi kaciju ispere, jedno za drugim, sa 25 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), a isprane tekućine prenesu u lijevak za odjeljivanje ili napravu za ekstrakciju.

Omjer vode i etanola u pomiješanim otopinama mora biti približno 2:1. Jako se mućka 2 minute i zatim ostavi stajati 2 minute.

5.3.1 Ekstrakcija lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3. ovoga Dijela)

Kad se slojevi razdvoje (vidi napomenu pod točkom 7.3. ovoga Dijela), sloj laganog petroleja se prenese u drugi lijevak za odjeljivanje (točka 4.2.3. ovoga Dijela). Ekstrakcija se ponovi dvaput sa 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela) i dvaput s 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela).

Pomiješani se ekstrakti u lijevku za odjeljivanje dvaput isperu sa 100 mL vode, uz lagano vrtloženje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano mućkanje s dodatnim količinama po 100 mL vode, sve dok voda pri dodavanju otopine fenolft aleina (točka 3.7. ovoga Dijela) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno

Izračun udjela vitamina A:

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

(EE za vitamin A palmitat = 957 na 326 nm u 2-propanolu)

5.6.3.3. *Standardna radna otopina vitamina A*

Pipetom se prenese 3,0 mL nerazrijeđene standardne radne otopine vitamina A, pripravljene sukladno točki 5.6.1. ovoga Dijela, u graduiranu tikvicu volumena 50 mL (točka 4.2.2. ovoga Dijela) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake. Pipetom se prenese 5,0 mL te otopine u graduiranu tikvicu volumena 25 mL i dopuni 2-propanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake. Nominalna koncentracija te otopine iznosi 6,72 IU vitamina A na mL.

Izmjeri se UV spektar te otopine prema 2-propanolu (točka 3.8. ovoga Dijela) u spektrofotometru (točka 4.6. ovoga Dijela) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Izračun udjela vitamina A:

$$\text{IU vitamina A/mL} = E_{325} \times 18,3$$

(EE za vitamin A alkohol = 1821 na 325 nm u 2-propanolu)

6. Izračun rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) pika vitamina A iz otopine uzorka određuje se koncentracija otopine uzorka u IU/mL iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.2. ovoga Dijela).

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

pri čemu je:

c = koncentracija vitamina A (točka 5.4. ovoga Dijela) otopine uzorka, iskazana u IU/mL;

V_1 = volumen otopine uzorka (točka 5.4. ovoga Dijela) u mL;

V_2 = volumen alikvotnog dijela korištenog u točki 5.4. ovoga Dijela, u mL;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina A može biti korisno pomiješati ekstrakte laganog petroleja iz dviju serija za saponifi kaciju (izvagana količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za HPLC određivanje.

7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela) za razbijanje emulzije.

7.4. Kod ulja iz jetre bakalara i drugih čistih masti vrijeme trajanja saponifi kacije treba produžiti na 45 – 60 minuta.

7.5. Umjesto BHT može se koristiti hidrokinon.

7.6. Izomere retinola moguće je razdvojiti običnom faznom kolonom. U ovom slučaju za izračune treba zbrojiti visine (površine) pika svih cis i trans izomera.

7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Pri analizi vitamina A u mliječnim zamjenicama treba paziti:

– kod saponifi kacije (točka 5.2. ovoga Dijela): zbog količine masti u uzorku može biti potrebna veća količina otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4. ovoga Dijela),

5.6. Kalibracija

5.6.1. Priprema standardnih radnih otopina

Pipetom se prenese 20 mL osnovne otopine vitamin A acetata (točka 3.11.1. ovoga Dijela) ili 20 mL osnovne otopine vitamin A palmitata (točka 3.12.1. ovoga Dijela) u tikvicu s ravnim dnom volumena 500 mL ili konusnu tikvicu (točka 4.2.1. ovoga Dijela) i hidrolizira sukladno točki 5.2. ovoga Dijela, ali bez dodatka BHT. Zatim se ekstrahira s laganim petrolejem (točka 3.2. ovoga Dijela) sukladno točki 5.3. ovoga Dijela i dopuni laganim petrolejem do 500 mL (točka 3.2. ovoga Dijela). U rotacijskom se otparivaču (vidi točku 5.4.) otpari 100 mL tog ekstrakta gotovo do suhog, u struji dušika otpari preostalo otapalo (točka 3.10. ovoga Dijela), a ostatak ponovo otopi u 10,0 mL metanola (točka 3.3. ovoga Dijela). Nominalna koncentracija

te otopine iznosi 560 IU vitamina A na mL. Točan udio treba se odrediti sukladno točki 5.6.3.3. ovoga Dijela. Standardna radna otopina treba se pripremiti svježa prije upotrebe. Pipetom se prenese 2,0 mL te standardne radne otopine u graduiranu tikvicu volumena 20 mL, dopuni metanolom (točka 3.3. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Nominalna koncentracija takve razrijeđene standardne radne otopine iznosi 56 IU vitamina A na mL.

5.6.2. *Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje*

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

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

5.6.3. *UV standardizacija standardnih otopina*

5.6.3.1. Osnovna otopina vitamin A acetata

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

Izračun udjela vitamina A:

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

(EE za vitamin A acetat = 1530 na 326 nm u 2-propanolu)

5.6.3.2. *Osnovna otopina vitamin A palmitata*

Pipetom se prenese 2,0 mL osnovne otopine vitamin A palmitata (točka 3.12.1. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 50 mL (točka 4.2.2. ovoga Dijela) i dopuni 2-propanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake. Nominalna koncentracija te otopine iznosi 56 IU vitamina A na mL. Pipetom se prenese 3,0 mL te razrijeđene otopine

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

Dio B.

ODREĐIVANJE VITAMINA E

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje udjela vitamina E u hrani za životinje i premiksima. Udio vitamina E iskazuje se u mg DL- α -tokoferol acetata na kg. Količina od 1 mg DL- α -tokoferol acetata odgovara 0,91 mg DL- α -tokoferola (vitamina E).

Granica kvantifikacije je 2 mg vitamina E/kg. Ta se granica kvantifikacije može dosegnuti samo fl uorescentnim detektorom.

Granica kvantifikacije za UV detektor iznosi 10 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se hidrolizira otopinom etanolnog kalijevog hidroksida, a vitamin E se ekstrahira laganim petrolejem. Otapalo se ukloni otparivanjem, a ostatak otopi u metanolu i po potrebi razrijedi do tražene koncentracije. Udio vitamina E određuje se visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom reverznih faza (RP-HPLC) i UV ili fl uorescentnim detektorom.

3. Reagensi

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

3.2. Lagani petrolej, vrelište 40 – 60 °C

3.3. Metanol

3.4. Otopina kalijevog hidroksida, $c = 50 \text{ g/100 mL}$

3.5. Otopina natrijevog askorbata, $c = 10 \text{ g/100 mL}$ (vidi napomenu pod točkom 7.7. ovoga Dijela)

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

3.6.1. Otopina natrijevog sulfida, $c = 0,5 \text{ mol/L}$ u glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/L}$ (za $X = 9$) (vidi napomenu pod točkom 7.8. ovoga Dijela)

3.7. Otopina fenolftaleina, $c = 2 \text{ g/100 mL}$ u etanolu (točka 3.1. ovoga Dijela)

3.8. Mobilna faza za HPLC: smjesa metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) i vode, npr. 980 + 20 (v + v). Točan se omjer određuje sukladno osobinama korištene kolone.

3.9. Dušik, bez kisika

3.10. DL- α -tokoferol acetat, posebne čistoće, certifi cirane aktivnosti

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

3.11. DL- α -tokoferol, posebne čistoće, certifi cirane aktivnosti

3.11.1. Osnovna otopina DL- α -tokoferola: odvagane se 100 mg DL- α -tokoferola (točka 3.10. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL. Otopi se u etanolu (točka 3.1. ovoga Dijela) i dopuni istim otapalom do oznake. 1 mL te otopine sadrži 1 mg DL- α -tokoferola. (Za UV kontrolu vidi točku 5.6.2.3. ovoga Dijela; za stabilizaciju vidi napomenu pod točkom 7.4. ovoga Dijela)

3.12 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (vidi napomenu pod točkom 7.5. ovoga Dijela)

4. Oprema

4.1. Rotacioni vakuum otparivač

4.2. Laboratorijsko posuđe od smeđeg stakla

– kod ekstrakcije (točka 5.3. ovoga Dijela): zbog prisutnosti emulzija može biti potrebno prilagoditi omjer voda/etanol 2:1.

Za provjeru pouzdanosti rezultata dobivenih korištenom analitičkom metodom na dotičnom specifi čnom matriksu (mliječna zamjenica) treba na dodatnom testnom uzorku izvršiti test iskorištenja. Ako je iskorištenje manje od 80%, rezultat analize treba korigirati za iskorištenje.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 15% u odnosu na najviši rezultat.

9. Rezultati međulaboratorijskog određivanja⁸

Premiks Dopunske

krmne

smjese

Mineralne

mješavine

Proteinske

dopunske

krmne

smjese

Krmne

smjese za

prasad

L 13 12 13 12 13

n 48 45 47 46 49

srednja

vrijednost

[IU/kg]

$17,02 \times$

10_6

$1,21 \times 10_6$ 537 100 151 800 18 070

Sr [IU/kg] $0,51 \times 10_6$ 0,039 $\times 10_6$ 22 080 12 280 682

r [IU/kg] $1,43 \times 10_6$ 0,109 $\times 10_6$ 61 824 34 384 1 910

CVr [%] 3,0 3,5 4,1 8,1 3,8

sR [IU/kg] $1,36 \times 10_6$ 0,069 $\times 10_6$ 46 300 23 060 3 614

R [IU/kg] $3,81 \times 10_6$ 0,193 $\times 10_6$ 129 640 64 568 10 119

CVR [%] 8,0 6,2 8,6 15 20

L = broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti;

sr = standardna devijacija ponovljivosti;

sR = standardna devijacija obnovljivosti;

r = ponovljivost;

R = obnovljivost;

CVr = koefi cijent varijacije ponovljivosti;

CVR = koefi cijent varijacije obnovljivosti.

Slika 3. Naprava za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela)

Stakleni valjak
(točka 4.8.1. ovoga Dijela)
(visine oko 48 cm)
Vođeni sloj
+
saponificirana
hrana za životinje
Sloj
laganog
petroleja
Uložak od brušenog stakla
(točka 4.8.2. ovoga Dijela)
(duljine oko 45 cm)
Prikladljiva
cijev

» Određivanje je provela radna skupina za hranu za životinje Verband Deutscher
Landwirtschaft licher Untersuchungs – und Forschungsanstalten
(VDLUFA).

se ispere s ukupno 250 mL vode. Zatim se tikvica za saponifi kaciju ispere, jedno za drugim, sa 25 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela) i isprane tekućine prenesu u lijevak za odjeljivanje ili napravu za ekstrakciju. Omjer vode i etanola u pomiješanim otopinama mora biti približno 2:1. Jako se mućka 2 minute, zatim ostavi stajati 2 minute.

5.3.1. Ekstrakcija s lijevkom za odjeljivanje (točka 4.2.3. ovoga Dijela)

Kad se slojevi odijele (vidi napomenu pod točkom 7.3), sloj laganog petroleja se prenese u drugi lijevak za odjeljivanje (točka 4.2.3. ovoga Dijela). Ekstrakcija se ponovi dvaput sa 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela) i dvaput s 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela).

Pomiješani ekstrakti u lijevku za odjeljivanje isperu se dvaput sa 100 mL vode, uz lagano vrtloženje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano mućkanje s dodatnim količinama po 100 mL vode, sve dok voda pri dodavanju otopine fenolft aleina (točka 3.7. ovoga Dijela) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani se ekstrakt fi ltrira kroz suhi nabrani fi ltar za razdvajanje faza (točka 4.4. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 500 mL (točka 4.2.2. ovoga Dijela) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odjeljivanje i fi ltar se isperu s 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), dopuni se laganim petrolejem (točka 3.2. ovoga Dijela) do oznake i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija napravom za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela)

Kada se slojevi odijele (vidi napomenu pod točkom 7.3. ovoga Dijela), zamijeni se slavina staklenog valjka (točka 4.8.1. ovoga Dijela) uloškom od brušenog stakla (točka 4.8.2. ovoga Dijela), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi odmah iznad razine veznog sklopa. Tlakom koji tvori dušik u bočnoj ručici gornji se sloj laganog petroleja prenese u lijevak za odjeljivanje volumena 1000 mL (točka 4.2.3. ovoga Dijela). U stakleni se valjak doda 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), začepi i dobro promućka. Pričeka se do razdvajanja slojeva, gornji se sloj prenese u lijevak za odjeljivanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), zatim dvaput s količinom od 50 mL laganog petroleja (točka 3.2. ovoga Dijela), a slojevi laganog petroleja dodaju u lijevak za odjeljivanje. Spojeni se ekstrakti laganog petroleja isperu, sukladno točki

5.3.1. ovoga Dijela, zatim se nastavi sukladno uputama u navedenoj točki.

5.4. *Priprema otopine uzorka za HPLC*

Alikvotni dio otopine laganog petroleja (iz točka 5.3.1. ili 5.3.2. ovoga Dijela) prenese se pipetom u kruškoliku tikvicu volumena 250 mL (točka 4.2.4. ovoga Dijela). Otapalo se otpari skoro do suhog pomoću rotacionog otparivača (točka 4.1. ovoga Dijela) pri sniženom tlaku i temperaturi kupelji do 40 °C. Dovođenjem dušika uspostavi se atmosferski tlak (točka 3.9. ovoga Dijela), a tikvica izvadi iz rotacionog otparivača. Preostalo se otapalo ukloni u struji dušika (točka 3.9. ovoga Dijela), a ostatak odmah otopi u poznatom volumenu (10 – 100 mL) metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) (koncentracija DL- α - tokoferola mora biti u području 5 μ g/mL do 30 μ g/mL).

5.5. *HPLC određivanje*

Vitamin E se razdvaja na koloni C₁₈ s reverznim fazama (točka 4.5.1. ovoga Dijela), a koncentracija izmjeri fl uorescentnim detektorom (ekscitacija: 295 nm, emisija: 330 nm) ili UV detektorom (292 nm) (točka 4.5.2. ovoga Dijela).

Injektira se alikvotni dio (npr. 20 μ L) otopine metanola dobivene u točki 5.4. ovoga Dijela i eluira mobilnom fazom (točka 3.8.

4.2.1. Tikvice s ravnim dnom ili konusne tikvice, volumena 500 mL, s brušenim vratom

4.2.2. Graduirane tikvice s čepovima od brušenog stakla, s uskim vratom, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL i 500 mL

4.2.3. Lijeenci za odjeljivanje, konusni, volumena 1000 mL, s čepovima od brušenog stakla

4.2.4. Kruškolike tikvice, volumena 250 mL, s čepovima od brušenog stakla

4.3. Allihnov kondenzator, duljine omotača 300 mm sa spojem od brušenog stakla i nastavkom za dovodnu cijev plina

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

4.5. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje

4.5.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm x 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 μ m ili ekvivalentna

4.5.2. UV ili fl uorescentni detektor s mogućnošću promjene valne duljine

4.6. Spektrofotometar s kvarcnim kivetama od 10 mm

4.7. Vodena kupelj s magnetnom miješalicom

4.8. Naprava za ekstrakciju (vidi sliku 4.) koja se sastoji od:

4.8.1. Staklenog valjka volumena od 1 L s vratom od brušenog stakla i čepom;

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

5. Postupak

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

5.1. Priprema uzorka

Uzorak se samelje tako da prolazi kroz sito veličine očice 1 mm, pri čemu treba izbjegavati stvaranje topline. Mljevenje se mora izvršiti neposredno prije vaganja i saponifikacije, inače može doći do gubitka vitamina E.

5.2. Saponifikacija

Ovisno o udjelu vitamina E, odvagane se 2 – 25 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u tikvicu s ravnim dnom volumena 500 mL ili konusnu tikvicu (točka 4.2.1. ovoga Dijela). Uz stalno vrtloženje, jedno za drugim se dodaje 130 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela), približno 100 mg BHT (točka 3.12. ovoga Dijela), 2 mL otopine natrijevog askorbata (točka 3.5. ovoga Dijela) i 2 mL otopine natrijevog sulfida (točka 3.6. ovoga Dijela). Na tikvicu se priključi kondenzator (točka 4.3. ovoga Dijela) i tikvica stavi u vodenu kupelj s magnetnom miješalicom (točka 4.7. ovoga Dijela). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi ključati uz refl uks. Kroz kondenzator (točka 4.3. ovoga Dijela) se doda 25 mL otopine kalijevog hidroksida (točka 3.4. ovoga Dijela) i ostavi uz refl uks sljedećih 25 minuta, uz miješanje u laganoj struji dušika. Zatim se kondenzator ispere s približno 20 mL vode, a sadržaj tikvice ohladi na sobnu temperaturu.

5.3. Ekstrakcija

Otopina za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odjeljivanje volumena 1000 mL (točka 4.2.3. ovoga Dijela) ili u napravu za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela), tako što

otopi u metanolu (točka 3.3. ovoga Dijela) i dopuni do oznake metanolom.

Nominalna koncentracija te otopine iznosi 40 µg DL-α-tokoferola na mL, što je ekvivalentno 44,0 µg DL-α-tokoferol acetata na mL. Standardna radna otopina treba se pripremiti svježa prije upotrebe.

5.6.2.2. Priprema kalibracijskih otopina i kalibracijske krivulje

Prenese se 1,0; 2,0; 4,0 i 10,0 mL standardne radne otopine u seriju graduiranih tikvica volumena 20 mL, metanolom (točka 3.3. ovoga Dijela) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije tih otopina iznose 2,0; 4,0; 8,0 i 20,0 µg/mL DL-α-tokoferola, tj. 2,20; 4,40; 8,79 i 22,8 µg/mL DL-α-tokoferol acetata.

Više puta se injektira 20 µL svake kalibracijske otopine i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) pika pripremi kalibracijska krivulja.

5.6.2.3. UV standardizacija osnovne otopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1. ovoga Dijela)

Etanolom se razrijedi 2,0 mL osnovne otopine DL-α-tokoferola (točka 3.11.1. ovoga Dijela) na 25,0 mL, izmjeri UV spektar te otopine prema etanolu (točka 3.1. ovoga Dijela) u spektrofotometru (točka 4.6. ovoga Dijela) između 250 i 320 nm. Maksimalna apsorpcija treba biti na 292 nm:

$$E = 75,8 \text{ na } 292 \text{ nm u etanolu}$$

Za to se razrjeđenje mora dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,6.

6. Izračun rezultata

Iz srednje se vrijednosti visine (površine) pika vitamina E iz otopine uzorka određuje koncentracija otopine uzorka u µg/mL (izračunana kao DL-α-tokoferol acetat) iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.1.2. ili 5.6.2.2. ovoga Dijela).

Udio vitamina E (w) u mg/kg u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

c = koncentracija vitamina E (kao α-tokoferol acetata) u otopini uzorka (točka 5.4. ovoga Dijela) u µg/mL;

V₁ = volumen otopine uzorka (točka 5.4. ovoga Dijela) u mL;

V₂ = volumen alikvotnog dijela korištenog u točki 5.4. ovoga Dijela, u mL;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka s niskom koncentracijom vitamina E može biti korisno pomiješati ekstrakte laganog petroleja iz dviju serija za saponifi kaciju (izvagana količina: 25 g) u jednu otopinu uzorka za HPLC određivanje.

7.2. Masa uzorka za analizu ne smije sadržavati više od 2 g masti.

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 mL etanola (točka 3.1. ovoga Dijela) za razbijanje emulzije.

7.4. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja otopine DL- α -tokoferol acetata ili otopine DL- α -tokoferola sukladno točki 5.6.1.3. ili 5.6.2.3. ovoga Dijela, doda se približno 10 mg BHT (točka 3.12. ovoga Dijela) u otopinu (točka 3.10.1. ili 3.10.2. ovoga Dijela), a otopina pohrani u hladnjaku (može se držati najviše 4 tjedna).

7.5. Umjesto BHT može se koristiti hidrokinon.

7.6. Običnom faznom kolonom može se odijeliti α -, β -, γ - i δ -tokoferol.

ovoga Dijela). Izračuna se srednja vrijednost visina (površina) pika za više injektiranja otopine istog uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pika za više injektiranja kalibracijskih otopina (točka 5.6.2. ovoga Dijela).

Uvjeti za HPLC

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.5.1. ovoga Dijela): 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 μ m ili ekvivalentna

Mobilna faza

(točka 3.8. ovoga Dijela): Smjesa metanola (točka 3.3. ovoga Dijela) i vode, npr. 980 + 20 (v + v)

Brzina protoka: 1 – 2 mL/min

Detektor

(točka 4.5.2. ovoga Dijela): 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. Standard DL- α -tokoferol acetata

5.6.1.1. Priprema standardne radne otopine

Pipetom se prenese 25 mL osnovne otopine DL- α -tokoferol acetata

(točka 3.10.1. ovoga Dijela) u tikvicu s ravnim dnom volumena 500 mL ili konusnu tikvicu (točka 4.2.1. ovoga Dijela) i hidrolizira, sukladno točki 5.2. Zatim se ekstrahira laganim petrolejem (točka 3.2. ovoga Dijela) sukladno točki 5.3. ovoga Dijela i laganim petrolejem dopuni do 500 mL. U rotacionom otparivaču (vidi točku 5.4. ovoga Dijela) otpari se 25 mL tog ekstrakta gotovo do suhog, u struji dušika ukloni preostalo otapalo (točka 3.9. ovoga Dijela), a ostatak se ponovo otopi u 25,0 mL metanola (točka 3.3. ovoga Dijela). Nominalna koncentracija te otopine iznosi 45,5 μg DL- α -tokoferola na mL, što je ekvivalentno 50 μg DL- α -tokoferol acetata na mL. Standardna radna otopina treba se pripremiti svježa prije upotrebe.

5.6.1.2. Priprema kalibracijske otopine i kalibracijske krivulje
Prenese se 1,0; 2,0; 4,0 i 10,0 mL standardne radne otopine u seriju graduiranih tikvica volumena 20 mL, metanolom (točka 3.3. ovoga Dijela) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije tih otopina iznose 2,5; 5,0; 10,0 i 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DL- α -tokoferol acetata, tj. 2,28; 4,55; 9,10 i 22,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DL- α -tokoferola.

Više puta se injektira 20 μL svake kalibracijske otopine i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) pika pripremi kalibracijska krivulja.

5.6.1.3. UV standardizacija osnovne otopine DL- α -tokoferol acetata (točka 3.10.1. ovoga Dijela)

Etanolom se razrijedi 5,0 mL osnovne otopine DL- α -tokoferol acetata (točka 3.10.1. ovoga Dijela) na 25,0 mL i izmjeri UV spektar te otopine prema etanolu (točka 3.1. ovoga Dijela) u spektrofotometru (točka 4.6. ovoga Dijela) između 250 i 320 nm.

Maksimalna apsorpcija treba biti na 284 nm:

$E = 43,6$ na 284 nm u etanolu

Za to se razrjeđenje mora dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,84 do 0,88.

5.6.2. *Standard DL- α -tokoferola*

5.6.2.1. Priprema standardne radne otopine

Pipetom se prenese 2 mL osnovne otopine DL- α -tokoferola (točka 3.11.1. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 50 mL,

Dio C.

ODREĐIVANJE ŽELJEZA, BAKRA, MANGANA I

CINKA U TRAGOVIMA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje željeza, bakra, mangana i cinka u tragovima u hrani za životinje. Granice kvantifikacije su:

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

2. Načelo

Nakon razgradnje eventualno prisutnih organskih tvari uzorak se otopi u kloridnoj kiselini. Nakon primjerenog razrjeđivanja, atomskom apsorpcijskom spektrometrijom određuju se elementi željezo, bakar, mangan i cink.

3. Reagensi

Uvodne napomene

Za pripremanje reagensa i otopina za analizu koristi se redestilirana voda bez kationa, (koje treba odrediti), dobivena redestilacijom u destilatoru od borosilikatnog ili kvarcnog stakla ili dvostrukom obradom ionsko-izmjenjivačkom smolom.

Reagensi moraju biti najmanje analitičke čistoće. Odsutnost elementa koji se određuje provjerava se slijepom probom. Po potrebi se reagensi moraju dodatno pročistiti.

Umjesto dolje navedenih standardnih otopina mogu se koristiti komercijalne standardne otopine pod uvjetom da imaju jamstvo i provjere se prije upotrebe.

3.1. Kloridna kiselina (d: 1,19 g/mL)

3.2. Kloridna kiselina (6 mol/L)

3.3. Kloridna kiselina (0,5 mol/L)

3.4. Fluoridna kiselina 38 – 40% (v/v) sa udjelom željeza (Fe) manjim od 1 mg/L i ostatkom nakon isparavanja manjim od 10 mg/L (u obliku sulfata)

3.5. Sulfatna kiselina (d: 1,84 g/mL)

3.6. Vodikov peroksid (približno 100 volumnih dijelova kisika (30% po masi))

3.7. Standardna otopina željeza (1000 µg Fe/mL), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina: otopi se 1 g željezne žice u 200 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka

3.2. ovoga Dijela), doda 16 mL vodikovog peroksida (točka 3.6. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.7.1. Standardna radna otopina željeza (100 µg Fe/mL), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.7. ovoga Dijela) s 9 dijelova vode.

3.8. Standardna otopina bakra (1000 µg Cu/mL), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:
– otopi se 1 g bakra u prahu u 25 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela), doda 5 mL vodikovog peroksida (točka 3.6. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.8.1. Standardna radna otopina bakra (10 µg Cu/mL), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.8. ovoga Dijela) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

3.9. Standardna otopina mangana (1000 µg Mn/mL), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:

7.7. Umjesto otopine natrijevog askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto otopine natrijevog sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Vitamin E acetat se u alkalnim uvjetima vrlo brzo hidrolizira, zato je vrlo osjetljiv na oksidaciju, osobito u prisutnosti elemenata u tragovima, poput željeza ili bakra. Postupak određivanja vitamina E u premiksima s razinama višim od 5000 mg/kg može dovesti do razgradnje vitamina E. Zbog toga se za potvrdu preporuča metoda HPLC s enzimskom razgradnjom struktura vitamina E bez alkalne saponifikacije.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 15% u odnosu na najviši rezultat.

9. Rezultati međulaboratorijskog određivanja⁹

Premiks Dopunske

krmne

smjese

Mineralne

mješavine

Proteinske

dopunske

krmne

smjese

Krmne
smjese za
prasad
L 12 12 12 12 12
n 48 48 48 48 48
srednja vrijednost
[mg/kg]
17 380 1 187 926 315 61,3
 s_r [mg/kg] 384 45,3 25,2 13,0 2,3
 r [mg/kg] 1 075 126,8 70,6 36,4 6,4
 CV_r [%] 2,2 3,8 2,7 4,1 3,8
 s_R [mg/kg] 830 65,0 55,5 18,9 7,8
 R [mg/kg] 2 324 182,0 155,4 52,9 21,8
 CV_R [%] 4,8 5,5 6,0 6,0 12,7
L = broj laboratorija;
n = broj pojedinačnih vrijednosti;
 s_r = standardna devijacija ponovljivosti;
 s_R = standardna devijacija obnovljivosti;
 r = ponovljivost;
 R = obnovljivost;
 CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti;
 CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti.

Slika 4. Naprava za ekstrakciju (točka 4.8. ovoga Dijela)

Stakleni valjak
(točka 4.8.1. ovoga Dijela)
(visine oko 48 cm)
Vodeni sloj
+
saponificirana
hrana za životinje
Sloj
laganog
petroleja
Uložak od brušenog stakla
(točka 4.8.2. ovoga Dijela)
(duljine oko 45 cm)
Prilagodljiva
cijev

9 Određivanje je provela radna skupina za hranu za životinje Verband Deutscher
Landwirtschaft licher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Pepeo se navlaži vodom i prenese u čašu volumena 250 mL.

Lončić se ispere s ukupno približno 5 mL kloridne kiseline (točka
3.1. ovoga Dijela), a udio se polako i oprezno prenese u čašu (može
doći do burne reakcije zbog tvorbe CO₂). U kapljicama se dodaje
kloridna kiselina (točka 3.1. ovoga Dijela), uz stalno miješanje dok
ne prestane pjenjenje. Otpari se do suhog, uz povremeno miješanje
staklenim štapićem.

Zatim se u ostatak doda 15 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i približno 120 mL vode. Promiješa se staklenim štapićem, koji se ostavi u čaši, a čaša se pokrije satnim staklom. Polako se zagrijava do ključanja i ostavi ključati do potpunog otapanja pepela. Filtrira se kroz fi ltar papir slobodan od pepela i prikupi u odmjernoj tikvici volumena 250 mL. Čaša i fi ltar se isperu s 5 mL vruće kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i dvaput vrelom vodom. Odmjerna se tikvica dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/L).

5.1.1.2. Ako ostatak na fi ltru izgleda crn (ugljik), ponovo se stavi u peć i spali na 450 – 475 °C. To je spaljivanje, za koje treba samo nekoliko sati (približno 3 – 5 sati), potpuno kada pepeo postane bijel ili gotovo bijel. Ostatak se otopi s približno 2 mL kloridne kiseline (točka 3.1. ovoga Dijela), otpari se do suhog i doda 5 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela). Zagrije se, otopina se fi ltrira u odmjernu tikvicu i dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/L).

Napomene:

(a) Pri određivanju elemenata u tragovima važno je biti na oprezu zbog opasnosti od onečišćenja, osobito cinkom, bakrom i željezom. Zbog toga oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ne smije sadržavati navedene metale.

Kako bi se smanjio opći rizik od onečišćenja treba raditi u atmosferi bez prašine s potpuno čistom opremom i temeljito opranim staklenim posuđem. Određivanje cinka osobito je osjetljivo na više vrsta onečišćenja, npr. staklenim posuđem, reagensima, prašinom itd.

(b) Masa uzorka koji se spaljuje izračunava se iz približnog udjela elemenata u tragovima u hrani za životinje s obzirom na osjetljivost korištenog spektrofotometra. Kod nekih vrsta hrane za životinje s niskim udjelom elemenata u tragovima trebat će možda započeti s 10 – 20 g uzorka i konačnu otopinu dopuniti do samo 100 mL.

(c) Spaljivanje se mora izvršiti u zatvorenoj peći bez upuhivanja zraka ili kisika.

(d) Temperatura na pirometru ne smije prijeći 475 °C.

5.1.2. Određivanje spektrofotometrijom

5.1.2.1. Priprema kalibracijske otopine

Za svaki element koji se određuje pripremi se serija kalibracijskih otopina iz standardnih radnih otopina iz točaka 3.7.1., 3.8.1.,

3.9.1. i 3.10.1. ovoga Dijela, pri čemu koncentracija HCl u svakoj iznosi približno 0,5 mol/L (i (kod željeza, mangana i cinka) koncentracija lantanovog klorida koja odgovara 0,1% La (w/v)).

Odabrane koncentracije elemenata u tragovima moraju biti unutar područja osjetljivosti korištenog spektrofotometra. U donjim se tablicama kao primjer navode tipična područja za kalibracijske otopine; ovisno o vrsti i osjetljivosti korištenog spektrofotometra možda će trebati odabrati drugačije koncentracije.

Željezo

μg Fe/mL 0 0,5 1 2 3 4 5

mL standardne radne otopine

– otopi se 1 g mangana u prahu u 25 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.9.1. Standardna radna otopina mangana (10 μg Mn/mL), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.9. ovoga Dijela) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

3.10. Standardna otopina cinka (1000 μg Zn/mL), pripravljena na sljedeći način ili ekvivalentna komercijalno dostupna otopina:

– otopi se 1 g cinka u foliji ili zrcima u 25 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

3.10.1. Standardna radna otopina cinka (10 μg Zn/mL), pripravljena razrjeđivanjem 1 dijela standardne otopine (točka 3.10. ovoga Dijela) s 9 dijelova vode, zatim razrjeđivanjem 1 dijela te otopine s 9 dijelova vode.

3.11. Otopina lantanovoga klorida: otopi se 12 g lantanovog oksida u 150 mL vode, doda se 100 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i dopuni vodom do 1 litre.

4. Oprema

4.1. Muflna peć s regulacijom temperature i po mogućnosti zapisivačem

4.2. Stakleni dijelova moraju biti od otpornog borosilikata, preporuča se upotreba opreme namijenjene isključivo određivanju elemenata u tragovima.

4.3. Atomski apsorpcijski spektrofotometar koji ispunjava zahtjeve metode glede osjetljivosti i točnosti u potrebnom području.

5. Postupak¹⁰

5.1. Uzorci koji sadrže organske tvari

5.1.1. Spaljivanje i priprema otopine za analizu¹¹

5.1.1.1. Odvagane se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,2 mg

i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine (vidi napomenu pod točkom (b) ovoga Odjeljka), osuši u sušioniku na 105 °C i postavi u hladnu mufolnu peć (točka 4.1. ovoga Dijela). Peć se zatvori (vidi napomenu pod točkom (c) ovoga Odjeljka), a temperatura se tijekom 90 minuta postupno digne na 450 – 475 °C. Ta se temperatura zadrži 4 – 16 sati (npr. preko noći) kako bi se uklonile organske tvari, zatim se peć otvori i ohladi (vidi napomenu pod točkom (d) ovoga Odjeljka).

¹⁰ Mogu se koristiti i druge metode za mineralizaciju ako dokazano jamče usporedive rezultate (poput, primjerice, mikrovalne mineralizacije pod tlakom).

¹¹ U zelenoj se krmi (svježoj ili osušenoj) mogu naći velike količine kvarca biljnog podrijetla, koji može sadržavati elemente u tragovima, i mora biti uklonjen. Kod uzoraka takve hrane za životinje treba provesti sljedeći izmijenjeni postupak. Provede se postupci iz točke 5.1.1.1. ovoga Dijela sve do fi ltracije. Filtarski se papir koji sadrži netopljiv ostatak dvaput ispere vrelom vodom i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine. Spali se u mufolnoj peći (točka 4.1. ovoga Dijela) na temperaturi nižoj od 550 °C do potpunog nestanka svih organskih tvari. Ostavi se ohladiti, doda nekoliko kapi vode i 10 – 15 mL fl uoridne kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela), zatim se otpari do suhog na otprilike 150 °C. Ako se u ostatku i dalje nalazi kvarcni pijesak, ponovno se otopi u nekoliko mililitara kloridne kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela) i otpari do suhog. Doda se pet kapi sulfatne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela) i grije dok ne prestane izlaziti bijeli dim. Nakon dodavanja 5 mL kloridne kiseline 6 mol/L (točka 3.2. ovoga Dijela) i oko 30 mL vode, zagrije se i otopina fi ltrira u odmjernu tikvicu volumena 250 mL te dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl oko 0,5 mol/L). Nastavi se s utvrđivanjem sukladno točki 5.1.2. ovoga Dijela.

Svako se mjerenje izvodi četiri puta.

5.2. Mineralna mješavina

Ako uzorak ne sadrži organske tvari, nije potrebno prethodno spaljivanje. Nastavlja se sukladno drugom stavku točke 5.1.1.1. ovoga Dijela. Može se izostaviti otparavanje u prisutnosti kloridne kiseline.

6. Izračun rezultata

Koncentracija elementa u tragovima u otopini koja se analizira izračuna se iz kalibracijske krivulje, a rezultat se iskazuje u miligramima

elemenata u tragovima na kilogram uzorka (ppm).

7. Ponovljivost

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

– 5 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio elementa u tragovima do 50 mg/kg,

– 10% u odnosu na viši rezultat za udio elementa u tragovima od 50 – 100 mg/kg,

– 10 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio elementa u tragovima od 100 – 200 mg/kg,

– 5% u odnosu na viši rezultat za udio elementa u tragovima iznad 200 mg/kg.

8. Napomena

Prisutnost velike količine fosfata može ometati postupak određivanja željeza, mangana i cinka. Takve se smetnje moraju korigirati dodavanjem otopine lantanovog klorida (točka 3.11. ovoga Dijela). Ako je maseni omjer u uzorku ($\text{Ca} + \text{Mg}/\text{P}$) > 2 , može se izostaviti dodavanje otopine lantanovog klorida (točka 3.11. ovoga Dijela) u otopinu za analizu i u kalibracijsku otopinu.

Dio D.

ODREĐIVANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil) acetoni]-kinazolin-4-(3H)-jeden hidrobromid

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine halofuginona u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. Načelo

Nakon obrade vrućom vodom halofuginon se ekstrahira u obliku slobodne baze u etil acetatu, zatim razdvoji kao hidroklorid u vodenoj otopini kiseline. Ekstrakt se pročisti ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Udio se halofuginona određuje visokodjelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) reverznih faza uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Acetonitril, za HPLC

3.2. Smola Amberlite XAD-2

3.3. Amonijev acetat

3.4. Etil acetat

3.5. Ledena octena kiselina

3.6. Standardna tvar halofuginon (DL-trans-7-brom-6-klor-3-[3-hidroksi-2-piperidil] acetoni]-kinazolin-4-(3H)– jedan hidrobromid, E 764)

(točka 3.7.1. ovoga Dijela)

(1 mL = 100 µg Fe) 0 0,5 1 2 3 4 5

mL HCl (točka 3.2. ovoga Dijela) 7 7 7 7 7 7 7

+ 10 mL otopine lantanovog klorida (točka 3.11. ovoga Dijela) i dopuniti vodom do 100 mL

Bakar

µg Cu/mL 0 0,1 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0

mL standardne radne otopine

(točka 3.8.1. ovoga Dijela)

(1 mL = 10 µg Cu) 0 1 2 4 6 8 10

mL HCl (točka 3.2. ovoga Dijela) 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 standardne radne otopine

(točka 3.9.1. ovoga Dijela)

(1 mL = 10 µg Mn) 0 1 2 4 6 8 10

mL HCl (točka 3.2. ovoga Dijela) 7 7 7 7 7 7 7

+ 10 mL otopine lantanovog klorida (točka 3.11. ovoga Dijela) i dopuniti vodom do 100 mL

Cink

µg Zn/mL 0 0,05 0,1 0,2 0,4 0,6 0,8

mL standardne radne otopine

(točka 3.10.1. ovoga Dijela)

(1 mL = 10 µg Zn) 0 0,5 1 2 4 6 8

mL HCl (točka 3.2. ovoga Dijela) 7 7 7 7 7 7 7

+ 10 mL otopine lantanovog klorida

(točka 3.11. ovoga Dijela) i

dopuniti vodom do 100 mL

5.1.2.2. Priprema otopine za analizu

Za određivanje bakra, otopina pripravljena sukladno točki

5.1.1. ovoga Dijela obično se može koristiti izravno. Ako je potrebno koncentraciju prilagoditi području kalibracijskih otopina, pipetom se prenese alikvotni dio u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i dopuni do oznake kloridnom kiselinom 0,5 mol/L (točka 3.3. ovoga Dijela).

Za određivanje željeza, mangana i cinka, pipetom se u odmjernu tikvicu volumena 100 mL prenese alikvotni dio otopine pripravljene

sukladno točki 5.1.1. ovoga Dijela, doda 10 mL otopine lantanovog klorida (točka 3.11. ovoga Dijela) i dopuni do oznake kloridnom kiselinom 0,5 mol/L (točka 3.3. ovoga Dijela) (vidi također napomenu pod točkom 8. ovoga Dijela).

5.1.2.3. Slijepa proba

Slijepa proba mora obuhvaćati sve propisane korake postupka, osim što se izostavlja uzorak. Kao otopina za slijepu probu ne smije se koristiti kalibracijska otopina » 0 «.

5.1.2.4. Mjerenje atomske apsorpcije

Oskidacijskim plamenom zrak-acetilen izmjeri se atomska apsorpcija kalibracijskih otopina na sljedećim valnim duljinama:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

STRANICA 40 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

4.4. HPLC oprema s ultravioletnim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 300 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 10 μm ili ekvivalentna kolona

4.5. Staklena kolona (300 mm × 10 mm) s fitrom od sinteriranog stakla i pipcem

4.6. Filtri od staklenih vlakana, promjera 150 mm

4.7. Membranski fitri, 0,45 μm

4.8. Membranski fitri, 0,22 μm

5. Postupak

Napomena: Halofuginon kao slobodna baza je nestabilan u bazičnim i etil-acetatnim otopinama. Ne smije se ostaviti u etil acetatu dulje od 30 minuta.

5.1. Općenito

5.1.1. Analizom slijepa probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan ni halofuginon niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja vrši se analizom slijepa probe hrane za životinje kojoj se doda količina halofuginona slična količini u uzorku. Za dobivanje koncentracije 3 mg/kg u 10 g slijepa probe hrane

za životinje doda se 300 µL osnovne standardne otopine (točka 3.6.1. ovoga Dijela), promiješa i prička 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (točka 5.2. ovoga Dijela).

Napomena: U provedbi ove metode slijepa proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost halofuginona.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se 10 g pripravljenog uzorka s preciznošću od 0,1 g i prenese u epruvetu za centrifugiranje volumena 200 mL, doda 0,5 g natrijevog askorbata (točka 3.10. ovoga Dijela), 0,5 g EDTA (točka 3.13. ovoga Dijela) i 20 mL vode i promiješa. Epruveta se 5 minuta drži u vodenoj kupelji (80 °C). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se 20 mL otopine natrijevog karbonata (točka 3.15. ovoga Dijela) i promiješa. Odmah se doda 100 mL etilacetata (točka 3.4. ovoga Dijela) i 15 sekundi jako mućka ručno. Zatim se epruveta 3 minute drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1. ovoga Dijela) i olabavi slavina. Centrifugira se 2 minute, faza etilacetata se dekantira kroz fi ltar iz staklenih vlakana (točka 4.6. ovoga Dijela) u lijevak za odjeljivanje volumena 500 mL. Ponovi se ekstrakcija uzorka s dodatnih 100 mL etilacetata. Pomiješani se kiselinski ekstrakti ispiru 1 minutu s 50 mL otopine natrijevog karbonata zasićene natrijevim kloridom (točka 3.16. ovoga Dijela), a vodeni se sloj odbaci.

Organski se sloj ekstrahira 1 minutu s 50 mL kloridne kiseline (točka 3.17. ovoga Dijela). Donji se kiselinski sloj prenese u lijevak za odjeljivanje volumena 250 mL. Organski se sloj ponovo ekstrahira 1,5 minutu s dodatnih 50 mL kloridne kiseline, ekstrakt se pomiješa s prvim ekstraktom. Pomiješani se kiselinski ekstrakti približno 10 sekundi ispiru mućkanjem s 10 mL etilacetata (točka 3.4. ovoga Dijela).

Vodeni se sloj kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL, organska se faza odbaci. Iz kisele se otopine u rotacijskom otparivaču (točka 4.2. ovoga Dijela) otpari sav preostali etilacetat. Temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Pod vakuumom na približno 25 milibara, odstrani se sav preostali etilacetat u 5 minuta na 38 °C.

5.3. Pročišćavanje

5.3.1. Priprema kolone s Amberlitom

Kolona XAD-2 se priprema za svaki ekstrakt uzorka. Metanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) se prenese 10 g pripravljenog Amber-

3.6.1. Osnovna standardna otopina halofuginona, 100 µg/mL

Odvagne se 50 mg halofuginona (točka 3.6. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 500 mL, otopi u puferskoj otopini amonijevog acetata (točka 3.18. ovoga Dijela), dopuni puferskom otopinom do oznake i promiješa. Ova je otopina stabilna tri tjedna na 5 °C ako se pohrani u tamnom prostoru.

3.6.2. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 100 mL prenese se 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 6,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.6.1. ovoga Dijela). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.21. ovoga Dijela) i promiješa. U ovim otopinama koncentracija halofuginona iznosi 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 6,0 µg/mL. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.7. Kloridna kiselina (p20 približno 1,16 g/mL)

3.8. Metanol

3.9. Srebrni nitrat

3.10. Natrijev askorbat

3.11. Natrijev karbonat

3.12. Natrijev klorid

3.13. EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol)

3.14. Voda, za HPLC

3.15. Otopina natrijevog karbonata, c = 10 g/100 mL

3.16. Otopina natrijevog karbonata zasićena natrijevim kloridom, c = 5 g/100 mL

U vodi se otopi 50 g natrijevog karbonata (točka 3.11. ovoga Dijela), razrijedi do 1 litre, zatim se dodaje natrijev klorid (točka 3.12. ovoga Dijela) do zasićenja otopine.

3.17. Kloridna kiselina, približno 0,1 mol/L

Vodom se razrijedi 10 mL HCl (točka 3.7. ovoga Dijela) do 1 litre.

3.18 Puferska otopina amonijevog acetata, približno 0,25 mol/L

U vodi (točka 3.14. ovoga Dijela) se otopi 19,3 g amonijevog acetata (točka 3.3. ovoga Dijela) i 30 mL octene kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela) i razrijedi do 1 litre.

3.19. Priprema smole Amberlite XAD-2

Vodom se ispere primjerena količina Amberlita (točka 3.2. ovoga Dijela) dok se ne uklone svi kloridni ioni, što se pokazuje pokusom sa srebrnim nitratom (točka 3.20. ovoga Dijela) u uklonjenoj vodenoj fazi. Zatim se smola ispere s 50 mL metanola (točka 3.8. ovoga Dijela), metanol ukloni, a smola pohrani u svježem metanolu.

3.20. Otopina srebrnog nitrata, približno 0,1 mol/L

Otopi se 0,17 g srebrnog nitrata (točka 3.9. ovoga Dijela) u 10 mL vode.

3.21. HPLC mobilna faza

Pomiješa se 500 mL acetonitrila (točka 3.1. ovoga Dijela) s 300 mL puferske otopine amonijevog acetata (točka 3.18. ovoga Dijela) i 1200 mL vode (točka 3.14. ovoga Dijela). Octenom se kiselinom vrijednost pH podesi na 4,3 (točka 3.5. ovoga Dijela). Filtrira se kroz fi ltar 0,22 μ m (točka 4.8. ovoga Dijela), otopina se otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji). Ova je otopina stabilna mjesec dana ako se drži u zatvorenoj posudi u tamnom prostoru.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučna kupelj

4.2. Rotacijski otparivač

4.3. Centrifuga

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 41

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

pri čemu je:

c = koncentracija halofuginona u otopini uzorka u μ g/mL;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. *Identifi kacija*

Identifi kacija analita može se potvrditi ko-kromatografi jom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.6.2. ovoga Dijela) koncentracije 6,0 μ g/mL.

7.1.1. Ko-kromatografi ja

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.6.2. ovoga Dijela). Količina dodanog halofuginona mora biti slična procijenjenoj količini halofuginona u ekstraktu uzorka. Dopušteno je povećanje samo visine pika halofuginona uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici maksimalne visine mora biti unutar $\times$ 10% početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra

standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;

(b) između 225 i 300 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije.

Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;

(c) između 225 i 300 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke. Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 0,5 mg/kg za udio halofuginona do 3 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak iskorištenje mora iznositi najmanje 80%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje u kojem se u osam laboratorija analiziralo tri uzorka.

Rezultati

Uzorak A

(slijepi) kod

prijama

Uzorak B (brašno) Uzorak C (pelete)

Kod

prijama

Nakon 2

mjeseca

Kod

prijama

Nakon 2

mjeseca

Srednja vrijednost

[mg/kg]

ND 2,80 2,42 2,89 2,45

¹² The Analyst 108, 1983., str. 1252-1256.

lita (točka 3.19. ovoga Dijela) u staklenu kolonu (točka 4.5. ovoga Dijela). Na vrh posteljice od smole postavi se tampon od staklene vune. Metanol se ispusti iz kolone, a smola ispere sa 100 mL vode tako da se dotok vode zaustavi kada tekućina dosegne vrh posteljice od smole. Prije upotrebe kolona se ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežila. Kolona se nikad ne smije ostaviti na suhom.

5.3.2. Čišćenje uzorka

Ekstrakt (točka 5.2. ovoga Dijela) se kvantitativno prenese na vrh pripremljene kolone s Amberlitom (točka 5.3.1. ovoga Dijela) i eluira, a eluat se odbaci. Brzina protoka ne smije biti veća od 20 mL/min. Tikvica s okruglim dnom se ispere s 20 mL kloridne kiseline (točka 3.17. ovoga Dijela), a udio iskoristi za ispiranje kolone sa smolom. Preostala se kiselinska otopina ukloni propuhivanjem zraka. Odbaci se tekućina od ispiranja. U kolonu se doda 100 mL metanola (točka 3.8. ovoga Dijela), 5 – 10 mL se eluira, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL. Preostali se metanol ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežio sa smolom; nastavi se eluiranje brzinom koja ne prelazi 20 mL/min, a eluat se prikuplja u istoj tikvici s okruglim dnom. Metanol se otpari na rotacijskom otparivaču (točka 4.2. ovoga Dijela), pri čemu temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 40 °C. Ostatak se s mobilnom fazom (točka 3.21. ovoga Dijela) kvantitativno prenese u građiranu tikvicu volumena 10 mL. Dopuni se mobilnom fazom do oznake i promiješa.

Alikvot se filtrira kroz membranski filter (točka 4.7. ovoga Dijela).

Ta se otopina pohrani za HPLC određivanje (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.4. HPLC određivanje

5.4.1. Parametri

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1. ovoga Dijela)

HPLC mobilna faza (točka 3.21. ovoga Dijela)

Brzina protoka: 1,5 – 2 mL/min

Valna duljina detekcije: 243 nm

Injektirani volumen: 40 do 100 µL

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 3,0 µg/mL (točka

3.6.2. ovoga Dijela) sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) pika i retencijska vremena.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Svaka se kalibracijska otopina (točka 3.6.2. ovoga Dijela) injektira više puta i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.3.2. ovoga Dijela), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pika halofuginona.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u $\mu\text{g/mL}$ određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika halofuginona u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2. ovoga Dijela).

Udio halofuginona (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

Filtrira se kroz fi ltar $0,22\ \mu\text{m}$ (točka 4.6. ovoga Dijela), otopina se zatim otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

3.9. Standardna tvar

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

3.9.1. Osnovna standardna otopina robenidina: $300\ \mu\text{g/mL}$

Odvagne se 30 mg standardnog robenidina (točka 3.9. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg. Otopi se u zakiseljenom metanolu (točka 3.2. ovoga Dijela) u graduiranoj tikvici volumena 100 mL, dopuni istim otapalom do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na tamnom.

3.9.2. Intermedijarna standardna otopina robenidina: $12\ \mu\text{g/mL}$

U graduiranu tikvicu volumena 250 mL prenese se 10,0 mL osnovne standardne otopine robenidina (točka 3.9.1. ovoga Dijela), dopuni mobilnom fazom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani na

tamnom.

3.9.3. Kalibracijske otopine

U seriju odmjernih tikvica volumena 50 mL prenese se 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 i 25,0 mL intermedijarne standardne otopine (točka 3.9.2. ovoga Dijela). Dopuni se mobilnom fazom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentracijama robenidina od 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 i 6,0 µg/mL. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.10. Voda za HPLC

4. Oprema

4.1. Staklena kolona

Iz smeđeg stakla, s pipcem i spremnikom volumena približno 150 mL, internog promjera 10 – 15 mm, dužine 250 mm

4.2. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica

4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač

4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda s radnim područjem od 250 – 400 nm

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm × 4 mm, C18, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili ekvivalentnim

4.5. Filtar papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentan)

4.6. Membranski filtri, 0,22 µm

4.7. Membranski filtri, 0,45 µm

5. Postupak

Napomena: Robenidin je osjetljiv na svjetlo. U svim se postupcima mora koristiti posuđe od smeđeg stakla.

5.1. *Općenito*

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan ni robenidin niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja vrši se analizom slijepe probe hrane za životinje (točka 5.1.1. ovoga Dijela) koja se obogati robenidinom u podjednakoj količini kao u uzorku. Za obogaćivanje na razinu od 60 mg/kg prenese se 3,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.9.1. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 250 mL. Otopina se otpari u struji dušika do približno 0,5 mL. Doda se 15 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa, ostavi 10 minuta i nastavi s ekstrakcijom (točka 5.2. ovoga Dijela).

Napomena: U provedbi ove metode slijepa proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost robenidina.

s_R [mg/kg] — 0, 0,43 0,40 0,42

CV_R [%] — 45 18 14 17

Rec. [%] 16 74 88 75

86

ND = nije detektirano;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti (%);

Rec. = iskorištenje (%).

Dio E.

ODREĐIVANJE ROBENIDINA

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

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine robenidina u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Ekstrakt se osuši i alikvotni dio pročisti na koloni aluminiјevog oksida. Robenidin se eluira metanolom iz kolone, koncentrira i dopuni mobilnom fazom do prikladnog volumena. Udio robenidina se određuje visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s reverznim fazama uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Zakiseljeni metanol

U graduiranu tikvicu volumena 500 mL prenese se 4,0 mL kloridne kiseline ($p_{20} = 1,18$ g/mL), dopuni metanolom do oznake (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.3. Acetonitril, za HPLC

3.4. Molekularno sito

Tip 3A, očice mreže 8 do 12 (očice promjera 1,6 – 2,5 mm, kristalni aluminiјev silikat, promjer pora 0,3 mm)

3.5. Aluminiјev oksid kiselinske aktivnosti I stupnja, za kolonsku kromatografiju

U prikladnu se posudu prenese 100 g aluminiјevog oksida i doda 2,0 mL vode. Začepi se i mućka približno 20 minuta. Drži se u čvrsto zatvorenoj posudi.

3.6. Otopina kalijevog dihidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/L

U vodi se otopi 3,40 g kalijevog dihidrogenfosfata (za HPLC) u graduiranoj tikvicu volumena 1000 mL, dopuni do oznake i promiješa.

3.7. Otopina dinatrijevog hidrogenfosfata, $c = 0,025 \text{ mol/L}$

U vodi se otopi 3,55 g bezvodnog dinatrijevog hidrogenfosfata (ili 4,45 g dihidrata ili 8,95 g dodekahidrata) (za HPLC) u graduiranoj tikvici volumena 1000 mL, dopuni do oznake i promiješa.

3.8. HPLC mobilna faza

Pomiješaju se sljedeći reagensi:

650 mL acetonitrila (točka 3.3. ovoga Dijela),

250 mL vode (za HPLC),

50 mL otopine kalijevog dihidrogenfosfata (točka 3.6. ovoga Dijela),

50 mL otopine dinatrijevog hidrogenfosfata (točka 3.7. ovoga Dijela).

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u $\mu\text{g/mL}$ određuje se iz srednje vrijednosti visina (površina) pika robenidina u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2. ovoga Dijela).

Udio robenidina (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

c = koncentracija robenidina u otopini uzorka u $\mu\text{g/mL}$;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.9.3. ovoga Dijela) koncentracije $6,0 \mu\text{g/mL}$.

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka doda se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.9.3. ovoga Dijela). Količina dodanog robenidina mora biti slična procijenjenoj količini robenidina u ekstraktu uzorka. Dopušteno je povećanje samo visine pika robenidina uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici maksimalne visine mora biti unutar približno $\pm 10\%$ početne

širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se procjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm$ 2 nm;
- (b) između 250 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;
- (c) između 250 i 400 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 10% vrijednosti u odnosu na viši rezultat za udio robenidina viši od 15 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje, iskorištenje mora iznositi najmanje 85%.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 15 g uzorka s preciznošću od 0,01 g.

Prenese se u konusnu tikvicu volumena 250 mL, doda 100,0 mL zakiseljenog metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), začepi i mućka jedan sat na tresilici (točka 4.2. ovoga Dijela). Otopina se fi ltrira kroz fi ltar papir od staklenih vlakana (točka 4.5. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 150 mL. Doda se 7,5 g molekularnog sita (točka 3.4. ovoga Dijela), začepi i mućka pet minuta. Odmah se fi ltrira kroz fi ltar papir od staklenih vlakana. Otopina se pohrani za fazu pročišćavanja (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. *Pročišćavanje*

5.3.1. Priprema kolone s aluminijevim oksidom

U donji dio staklene kolone postavi se mali čep od staklene vune (točka 4.1. ovoga Dijela) i potisne staklenim štapićem. Odvagne se 11,0 g pripravljenog aluminijevog oksida (točka 3.5. ovoga Dijela) i prenese u kolonu. Pri tom izloženost zraku tijekom navedenog postupka treba biti što je moguće manja. Laganim udarcima po donjem dijelu napunjene kolone istaloži se aluminijev oksid.

5.3.2. Pročišćavanje uzorka

U kolonu se pipetom prenese 5,0 mL ekstrakta uzorka pripravljenog u (točka 5.2. ovoga Dijela). Vrh pipete se nasloni na stjenku kolone, zatim se pusti da aluminijev oksid apsorbira otopinu. Robenidin se eluira iz kolone sa 100 mL metanola (točka 3.1. ovoga Dijela) uz brzinu protoka od 2 – 3 mL/min, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 mL. Otopina metanola se otpari u rotacijskom otparivaču (točka 4.3. ovoga Dijela) do suhog pri sniženom tlaku na 40 °C. Ostatak se ponovo otopi u 3 – 4 mL mobilne faze (točka 3.8. ovoga Dijela) i kvantitativno prenese u graduiranu tikvicu volumena 10 mL. Tikvica se nekoliko puta ispere količinom od 1 – 2 mL mobilne faze, a isprana tekućina prenese u graduiranu tikvicu. Dopuni se istim otapalom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.7. ovoga Dijela). Otopina se pohrani za HPLC određivanje (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.4. *HPLC određivanje*

5.4.1. Parametri

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1. ovoga Dijela),

HPLC mobilna faza (točka 3.8. ovoga Dijela),

brzina protoka: 1,5 – 2 mL/min,

valna duljina detekcije: 317 nm,

injektirani volumen: 20 – 50 µL.

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 3,6 µg/mL (točka 3.9.3. ovoga Dijela) sve dok se ne postignu konstantne visine pika i konstantna vremena retencije.

5.4.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.9.3. ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se na ordinatu

nanose srednje vrijednosti visina ili površina pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.3.2. ovoga Dijela), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pika robenidina.

đeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.8.2. Standardna otopina diklazurila, $50\text{ }\mu\text{g/mL}$

U graduiranu tikvicu volumena 50 mL prenese se $5,00\text{ mL}$ osnovne standardne otopine (točka 3.8.1. ovoga Dijela), dopuni s DMF (točka 3.6. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9. Interni standard: 2,6 diklor- α -(4-klorfenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H)- il) α -metilbenzen-acetonitril.

3.9.1. Osnovna otopina internog standarda, $500\text{ }\mu\text{g/mL}$

Odvagne se 25 mg internog standarda (točka 3.9. ovoga Dijela) s preciznošću od $0,1\text{ mg}$ i prenese u graduiranu tikvicu volumena 50 mL . Otopi se u DMF (točka 3.6. ovoga Dijela), tikvica se dopuni s DMF (točka 3.6. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.2. Otopina internog standarda, $50\text{ }\mu\text{g/mL}$

U graduiranu tikvicu volumena 50 mL prenese se $5,00\text{ mL}$ osnovne otopine internog standarda (točka 3.9.1. ovoga Dijela), dopuni s DMF (točka 3.6. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.9.3. Otopina internog standarda za premikse, $p/1000\text{ mg/mL}$

(p = nominalni udio diklazurila u premiksu, u mg/kg)

Odvagne se p/10 mg internog standarda s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL, otopi u DMF (točka 3.6. ovoga Dijela) u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.6. ovoga Dijela), dopuni s DMF do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi ≤ 4 °C otopina je stabilna 1 mjesec.

3.10. Kalibracijska otopina, 2 µg/mL

Pipetom se prenese 2,00 mL standardne otopine diklazurila (točka 3.8.2. ovoga Dijela) i 2,00 mL otopine internog standarda (točka 3.9.2. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 50 mL. Doda se 16 mL DMF (točka 3.6. ovoga Dijela), tikvica se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.11. C₁₈ kolona za ekstrakciju u krutoj fazi, npr. Bond Elut, veličina: 1 cc, masa punila: 100 mg

3.12. Ekstrakcijsko otapalo: zakiseljeni metanol

Pipetom se prenese 5,0 mL kloridne kiseline (točka 3.7. ovoga Dijela) u 1000 mL metanola (točka 3.5. ovoga Dijela) i promiješa.

3.13. HPLC mobilna faza

3.13.1 Eluent A: otopina amonijevog acetata i tetrabutilamonijevog hidrogen sulfata

Otopi se 5 g amonijevog acetata (točka 3.2. ovoga Dijela) i 3,4 g TBHS (točka 3.3. ovoga Dijela) u 1000 mL vode (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (točka 3.4. ovoga Dijela)

3.13.3. Eluent C: metanol (točka 3.5. ovoga Dijela)

4. Oprema

4.1. Mehanička tresilica

4.2. Oprema za HPLC s ternarnim gradijentom

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje na razini EU u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za perad i kuniće u obliku brašna ili peleta. Svaki se uzorak analizirao dvaput.

Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

perad kunići

Brašno Pelete Brašno Pelete

Srednja vrijednost [mg/kg] 27,00 27,99 43,6 40,1

sr [mg/kg] 1,46 1,26 1,44 1,66

CV_r [%] 5,4 4,5 3,3 4,1

s_R [mg/kg] 4,36 3,36 4,61 3,91

CV_R [%] 16,1 12,0 10,6 9,7

Iskorištenje [%] 90,0 93,3 87,2 80,2

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti u %;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti u %.

Dio F.

ODREĐIVANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitril

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje udjela diklazurila u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije iznosi 0,1 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,5 mg/kg.

2. Načelo

Nakon dodavanja internog standarda, uzorak se ekstrahira zakiseljenim metanolom. Kod hrane za životinje alikvotni se dio ekstrakta pročisti na C₁₈ koloni za ekstrakciju u krutoj fazi. Diklazuril se eluira sa kolone smjesom zakiseljenog metanola i vode. Nakon otparavanja, ostatak se otopi u smjesi DMF/voda. Kod premiksa, ekstrakt se otpari, a ostatak otopi u smjesi DMF/voda. Udio diklazurila određuje se visokodjelatnom tekućinskom kromatografi jom (HPLC) s reverznom fazom i ternarnim gradijentom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Voda, za HPLC

3.2. Amonijev acetat

3.3. Tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBHS)

3.4. Acetonitril, za HPLC

3.5. Metanol, za HPLC

3.6. N,N-dimetilformamid (DMF)

3.7. Kloridna kiselina, p20 = 1,19 g/mL

3.8. Standardna tvar: Diklazuril II-24: (+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetonitril, zajamčene čistoće, E771.

3.8.1. Osnovna standardna otopina diklazurila, 500 µg/mL

Odvagne se 25 mg standardne tvari diklazurila (točka 3.8. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 50 mL. Otopi se u DMF (točka 3.6. ovoga Dijela), tikvica se dopuni s DMF (točka 3.6. ovoga Dijela) do oznake i promiješa.

Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeponedjeljak,

27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 45

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

sniženim tlakom na 60 °C u rotacijskom otparivaču (točka 4.3. ovoga Dijela) dok se ne počne sušiti. Ostatak se ponovo otopi u 10,0 mL DMF (točka 3.6. ovoga Dijela), doda 15,0 mL vode (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa. Prelazi se na postupak HPLC određivanja (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.2.1. ovoga Dijela):

100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm ili ekvivalentna

Mobilna faza: Eluent A (točka 3.13.1. ovoga Dijela):

vodena otopina amonijevog acetata i tetrabutil amonijevog hidrogen sulfata

Eluent B (točka 3.13.2. ovoga Dijela): acetonitril

Eluent C (točka 3.13.3. ovoga Dijela): metanol

Način protoka: – linearni gradijent

– početni uvjeti: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)

– nakon 10 minuta, protok s gradijentom tijekom 30 minuta do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).

Ispiranje 10 minuta s B.

Brzina protoka: 1,5 – 2 mL/min

Injektirani volumen: 20 µL

Valna duljina detekcije: 280 nm

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 2,0 µg/mL (točka 3.10. ovoga Dijela) sve dok se ne postignu konstantne visine pika i

konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska otopina

Više puta se injektira kalibracijska otopina (točka 3.10. ovoga Dijela) i odredi srednja vrijednost visine (površine) pika diklazurila i pikova internog standarda.

5.3.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira 20 μL otopine uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2. ovoga Dijela) i odredi srednja vrijednost visine (površine) pika diklazurila i pikova internog standarda.

6. Izračun rezultata

6.1. *Hrana za životinje*

Udio diklazurila w (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

$h_{d,s}$ = visina (površina) pika diklazurila u otopini uzorka (točka 5.2.1. ovoga Dijela);

$h_{i,s}$ = visina (površina) pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.1. ovoga Dijela);

$h_{d,c}$ = visina (površina) pika diklazurila u kalibracijskoj otopini (točka 3.10. ovoga Dijela);

4.2.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 μm , 100 mm x 4,6 mm ili ekvivalentna

4.2.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda.

4.3. Tankoslojni rotacijski otparivač

4.4. Membranski filter, 0,45 μm

4.5. Vakuumski ventil

4.6. Ultrazvučna kupelj

5. Postupak

5.1. Općenito

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan ni diklazuril niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost diklazurila ili interferentnih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja vrši se analizom slijepe probe hrane za životinje obogaćenoj količinom diklazurila u podjednakoj količini kao u uzorku. Za dobivanje koncentracije 1 mg/kg dodaje se 0,1 mL osnovne standardne otopine (točka 3.8.1. ovoga Dijela) u 50 g slijepe probe

hrane za životinje, temeljito promiješa i ostavi 10 minuta, a prije nastavka (točka 5.2. ovoga Dijela) se miješanje više puta ponovi. Ako nije dostupna slijepa probe hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidi točku 5.1.1. ovoga Dijela), test iskorištenja može se provesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati količinom diklazurila sličnom onoj koja se već nalazi u uzorku. Uzorak se analizira zajedno s uzorkom bez dodanog diklazurila, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1 Hrana za životinje

Odvagne se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu volumena 500 mL, doda 1,00 mL otopine internog standarda (točka 3.9.2. ovoga Dijela) i 200 mL ekstrakcijskog otapala (točka 3.12. ovoga Dijela), zatim se tikvica zatvori.

Smjesa se preko noći protresa u tresilici (točka 4.1. ovoga Dijela). Ostavi se istaložiti 10 minuta. U primjerenu staklenu posudu prenese se alikvot 20 mL supernatanta i razrijedi s 20 mL vode. Ova se otopina prenese u kolonu za ekstrakciju (točka 3.11. ovoga Dijela) i fi ltrira pod vakuumom (točka 4.5. ovoga Dijela). Kolona se ispere s 25 mL smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12. ovoga Dijela) i vode, 65 + 35 (V + V). Prikupljene se frakcije odbace, a spojevi eluiraju s 25 mL smjese ekstrakcijskog otapala (točka 3.12. ovoga Dijela) i vode, 80 + 20 (V + V). Ova se frakcija otparava u rotacijskom otparivaču (točka 4.3. ovoga Dijela) pri 60 °C dok se ne počne sušiti. Ostatak se otopi u 1,0 mL DMF (točka 3.6. ovoga Dijela), doda 1,5 mL vode (točka 3.1. ovoga Dijela) i promiješa. Filtrira se kroz membranski fi ltar (točka 4.4. ovoga Dijela). Prelazi se na postupak HPLC određivanja (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g. Prenese se u konusnu tikvicu volumena 500 mL, doda se 1,00 mL otopine internog standarda (točka 3.9.3. ovoga Dijela) i 200 mL ekstrakcijskog otapala (točka 3.12. ovoga Dijela), zatim se tikvica zatvori.

Smjesa se preko noći protresa u tresilici (točka 4.1. ovoga Dijela). Ostavi se istaložiti 10 minuta. U primjereno veliku staklenu tikvicu s okruglim dnom prenese se alikvot (10000/p mL, p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksu) supernatanta. Otparava se pod

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;

(c) između 230 i 320 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena 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. Iskorištenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje u kojem se u 11 laboratorija analiziralo 5 uzoraka. Ti su uzorci sačinjeni iz dva premiksa; jedan je bio pomiješan s organskim matriksom (O 100), a drugi s anorganskim matriksom (A 100). Teoretski udio iznosi 100 mg diklazurila na kg. Tri različita proizvođača (NL) (L1/Z1/K1) proizvela su 3 mješavine hrane za perad. Teoretski udio iznosi 1 mg diklazurila na kg. Od laboratorija je zatraženo da svaki uzorak analiziraju jedanput ili dvaput. (Detaljnije informacije o navedenom međulaboratorijskom određivanju mogu se pronaći u *Journal of AOAC International*, svezak 77, br. 6, 1994., str. 1359–1361). Rezultati su prikazani u donjoj tablici.

Uzorak 1 Uzorak 2 Uzorak 3 Uzorak 4 Uzorak 5

A 100 O 100 L1 Z1 K1

L 11 11 11 11 6

n 19 18 19 19 12

Srednja

vrijednost

100,8 103,5 0,89 1,15 0,89

s_r (mg/kg) 5,88 7,64 0,15 0,02 0,03

CV_r (%) 5,83 7,38 17,32 1,92 3,34

s_R (mg/kg) 7,59 7,64 0,17 0,11 0,12

CV_R (%) 7,53 7,38 18,61 9,67 13,65

Nominalni udio

(mg/kg)

100 100 1 1 1

L = broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti;

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti.

9. Napomena

Prethodno treba dokazati da je odziv diklazurila linearan u području koncentracija koje se mjere.

$h_{i,c}$ = visina (površina) pika internog standarda u kalibracijskoj otopini (točka 3.10. ovoga Dijela);

$c_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracijskoj otopini u $\mu\text{g/mL}$ (točka 3.10. ovoga Dijela);

m = masa testnog uzorka u gramima;

V = volumen ekstrakta uzorka sukladno točki 5.2.1. ovoga Dijela (tj. 2,5 mL).

6.2. Premiksi

Udio diklazurila w (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

$h_{d,c}$ = visina (površina) pika diklazurila u kalibracijskoj otopini (točka 3.10. ovoga Dijela);

$h_{i,c}$ = visina (površina) pika internog standarda u kalibracijskoj otopini (točka 3.10. ovoga Dijela);

$h_{d,s}$ = visina (površina) pika diklazurila u otopini uzorka (točka 5.2.2. ovoga Dijela);

$h_{i,s}$ = visina (površina) pika internog standarda u otopini uzorka (točka 5.2.2. ovoga Dijela);

$c_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracijskoj otopini u $\mu\text{g/mL}$

(točka 3.10. ovoga Dijela);

m = masa testnog uzorka u gramima;

V = volumen ekstrakta uzorka sukladno točki 5.2.2. ovoga Dijela

(tj. 25 mL);

p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksi.

7. Validacija rezultata

7.1 Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2. ovoga Dijela) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.10. ovoga Dijela).

7.1.1. Ko-kromatografija

U ekstrakt uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2. ovoga Dijela) dodaje se primjerena količina kalibracijske otopine (točka 3.10. ovoga Dijela). Količina obogaćenja sa diklazurilom mora biti podjednaka količini diklazurila određenoj u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika diklazurila i pika internog standarda uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici visine mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika diklazurila ili pika internog standarda neobogaćenog uzorka ekstrakta.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda

Rezultati se procjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm 2\text{ nm}$;

(b) između 230 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije.

Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše

(točka 3.8. ovoga Dijela) i promiješa. Ove otopine odgovaraju 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 i 10,0 µg lasalocid natrija na mL. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.11. Voda, za HPLC

4. Oprema

4.1. Ultrazvučna kupelj (ili vodena kupelj s protresanjem) s kontrolom temperature

4.2. Membranski filtri, 0,45 µm

4.3. Oprema za visoko djelatnu tekućinsku kromatografiju (HPLC) sa sustavom za injektiranje primjerenim za injektiranje volumena od 20 µL

4.3.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju 125 mm x 4 mm, reverzna faza C18, veličina čestica punjenja 5 µm ili ekvivalentna

4.3.2. Spektrofotometar s mogućnošću promjene valne duljine (ekscitacije i emisije)

5. Postupak

5.1. Općenito

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Za provedbu testa iskorištenja (točka 5.1.2. ovoga Dijela) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nije prisutan ni lasalocid natrij niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje treba biti slične vrste kao uzorak, a analizom se mora potvrditi odsutnost lasalocid natrija ili interferentnih tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine lasalocid natrija koja je slična količini u uzorku. Za obogaćivanje na razinu 100 mg/kg prenese se 10,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.10.1. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 250 mL i otopina otpari do približno 0,5 mL. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, temeljito promiješa i ostavi 10 minuta, a prije ekstrakcije miješanje se više puta ponovi (točka 5.2. ovoga Dijela).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slične vrste kao uzorak (vidi točku 5.1.1. ovoga Dijela), test iskorištenja može se provesti metodom s dodavanjem standarda. U tom se slučaju uzorku za analizu obogati količinom lasalocid natrija koja je podjednaka onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Hrana za životinje

Odvagne se 5 – 10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu volumena 250 mL s čepom. Pipetom se doda 100,0 mL zakiseljenog metanola (točka 3.8. ovoga Dijela). Poklopac se lagano zatvori i tikvica protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1. ovoga Dijela) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Ostavi se odstajati približno 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (točka 4.2. ovoga Dijela) u prikladnu posudu. Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.2.2. Premiksi

Odvagne se približno 2 g neusitnjenog premiksa s preciznošću od 0,001 g i prenese u graduiranu tikvicu volumena 250 mL. Doda se 100,0 mL zakiseljenog metanola (točka 3.8. ovoga Dijela), tikvica se protrese radi disperzije uzorka. Tikvica se sa sadržajem drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1. ovoga Dijela) na približno Dio G.

ODREĐIVANJE LASALOCID NATRIJA

Natrijeva sol polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine lasalocid natrija u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije iznosi 5 mg/kg, a granica kvantifikacije 10 mg/kg.

2. Načelo

Lasalocid natrij se ekstrahira iz uzorka u zakiseljeni metanol i određuje visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu spektrofotometrijskog detektora.

3. Reagensi

3.1. Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄)

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

3.3. Otopina ortofosforne kiseline, c = 20%

Razrijedi se 23,5 mL ortofosforne kiseline (točka 3.2. ovoga Dijela) sa 100 mL vode.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), w (w/w) = 99%

3.5. Metanol, za HPLC

3.6. Kloridna kiselina, gustoća = 1,19 g/mL

3.7. Otopina fosfatnog pufera, c = 0,01 mol/L

Otopi se 1,36 g KH₂PO₄ (točka 3.1. ovoga Dijela) u 500 mL vode (točka 3.11.), doda se 3,5 mL ortofosforne kiseline (točka 3.2.

ovoga Dijela) i 10,0 mL 6-metil-2-heptilamina (točka 3.4. ovoga Dijela).

Otopinom ortofosforne kiseline (točka 3.3. ovoga Dijela) pH vrijednost se podesi na 4,0 i razrijedi vodom (točka 3.11. ovoga Dijela) do 1000 mL.

3.8. Zakiseljeni metanol

U graduiranu tikvicu volumena 1000 mL prenese se 5,0 mL kloridne kiseline (točka 3.6. ovoga Dijela), dopuni metanolom (točka 3.5. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.9. HPLC mobilna faza, otopina fosfatnog pufera i metanola 5 + 95 (V + V)

Promiješa se 5 mL otopine fosfatnog pufera (točka 3.7. ovoga Dijela) s 95 mL metanola (točka 3.5. ovoga Dijela).

3.10. Lasalocid natrij standardna tvar, zajamčene čistoće, C₃₄H₅₃O₈Na (natrijeva sol polimer monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1. Osnovna standardna otopina lasalocid natrija, 500 µg/mL
Odvagane se 50 mg lasalocid natrija (točka 3.10. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 100 mL, otopi u zakiseljenom metanolu (točka 3.8. ovoga Dijela) i istim otapalom dopuni do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.2. Intermedijarna standardna otopina lasalocid natrija, 50 µg/mL

Pipetom se prenese 10,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.10.1. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 100 mL i zakiseljenim metanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) dopuni do oznake i promiješa. Ova se otopina mora pripremiti svježa prije uporabe.

3.10.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 50 mL prenese se 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 i 10,0 mL intermedijarne standardne otopine (točka

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.1. ovoga Dijela) u µg/mL;

V_1 = volumen ekstrakta uzorka sukladno točki 5.2.1. ovoga Dijela u mL (tj. 100);

m = masa testnog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrija u otopini uzorka (točka 5.2.2. ovoga Dijela) u $\mu\text{g/mL}$;

V_2 = volumen ekstrakta uzorka sukladno točki 5.2.2. ovoga Dijela u mL (tj. 250);

f = faktor razrjeđenja sukladno točki 5.2.2. ovoga Dijela;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Metode koje se temelje na spektrofotometriji manje su podložne interferencijama od metoda kod kojih se koristi UV detekcija.

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom.

7.1.1. Ko-kromatografija

Ekstrakt uzorka (točka 5.2.1. ili 5.2.2. ovoga Dijela) obogati se primjerenom količinom kalibracijske otopine (točka 3.10.3. ovoga Dijela). Količina dodanog lasalocid natrija mora biti podjednaka količini lasalocid natrija u ekstraktu uzorka. Smije se povećati samo visina pika lasalocid natrija uzimajući u obzir količine dodanog lasalocid natrija i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika, na polovici visine, mora biti unutar $\pm 10\%$ početne vrijednosti širine pika dobivene iz neobogaćenog ekstrakta uzorka.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio lasalocid natrija od 30 – 100 mg/kg,
- 15 mg/kg za udio lasalocid natrija od 100 – 200 mg/kg,
- 7,5% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio lasalocid natrija veći od 200 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorištenje mora iznositi najmanje 80%. Za obogaćene uzorke premiksa iskorištenje mora iznositi najmanje 90%.

40 °C, zatim se izvadi iz kupelji i ohladi na sobnu temperaturu. Zakiseljenim

se metanolom (točka 3.8. ovoga Dijela) razrijedi do oznake i dobro promiješa. Ostavi se odstajati 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio fi ltrira kroz membranski fi ltar 0,45 µm (točka 4.2. ovoga Dijela). Prikladan volumen čistog fi ltrata razrijedi se zakiseljenim metanolom (točka 3.8. ovoga Dijela), čime se dobiva konačna testna otopina koncentracije približno 4 µg/mL lasalocid natrija. Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.3.1.

ovoga Dijela):

125 mm × 4 mm, reverzna faza C₁₈,

veličina čestica punjenja 5 µm ili

ekvivalentna

Mobilna faza (točka 3.9.

ovoga Dijela):

Smjesa otopine fosfatnog pufera (točka

3.7. ovoga Dijela) i metanola (točka

3.5. ovoga Dijela), 5 + 95 (V + V)

Brzina protoka: 1,2 mL/min

Valna duljina detekcije:

Ekscitacija: 310 nm

Emisija: 419 nm

Injektirani volumen: 20 µL

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 4,0 µg/mL (točka 3.10.3. ovoga Dijela) sve dok se ne postignu konstantne visine (ili površine) pika i konstantna vremena retencije.

5.3.2. Kalibracijska krivulja

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.10.3. ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/mL.

5.3.3. Otopina uzorka

Više puta se injektiraju ekstrakti uzorka dobiveni u točki 5.2.1.

ili 5.2.2. ovoga Dijela, pri čemu se koristi jednak volumen kao za

kalibracijsku otopinu i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pika lasalocid natrija.

6. Izračun rezultata

Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) pika dobivenih injektiranjem otopine uzorka (točka 5.3.3. ovoga Dijela) određuje koncentracija lasalocid natrija ($\mu\text{g/mL}$) iz kalibracijske krivulje.

6.1. *Hrana za životinje*

Udio lasalocid natrija (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje* u kojem se u 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 tablici:

Uzorak 1

Premiks za

piliće

Uzorak 2

Premiks za

purane

Uzorak 3

Pelete za

purane

Uzorak 4

Mrvica za

piliće

Uzorak 5

Hrana za

purane

Uzorak 6

Hrana za

perad A

Uzorak 7

Hrana za

perad B

L 12 12 12 12 12 12 12

n 23 23 23 23 23 23 23

*Analyst, 1995., 120, 2175-2180;

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

Srednja vrijednost [mg/kg] 5 050 16 200 76,5 78,4 92,9 48,3 32,6

s_r 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 pripravljena u laboratoriju.

L = broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti;

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti u %;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti u %;

PRILOG V.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU NEPOŽELJNIH TVARI U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Dio A.

ODREĐIVANJE SLOBODNOG I UKUPNOG GOSIPOLA

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućava određivanje razine slobodnog i ukupnog gosipola te kemijski srodnih tvari u sjemenu, brašnu i pogači od pamukovog sjemena te u krmnim smjesama koje sadrže navedene sirovine za krmiva kada je koncentracija slobodnog i ukupnog gosipola te kemijski srodnih tvari veća od 20 mg/kg.

2. Načelo

Gosipol se ekstrahira u prisutnosti 3-aminopropan-1-ola ili smjesom propan-2-ola i heksana, kod određivanja slobodnog gosipola ili u prisutnosti dimetilformamida kod određivanja ukupnog gosipola. Gosipol sa anilinom prelazi u gosipol-dianilin, čija se optička gustoća mjeri na 440 nm.

3. Reagensi

3.1. Smjesa propan-2-ol-heksan: pomiješa se 60 volumnih dijelova propan-2-ola s 40 volumnih dijelova n-heksana.

3.2. Otapalo A: U graduiranu tikvicu volumena 1 L doda se

približno 500 mL smjese propan-2-ol-heksan (točka 3.1. ovoga Dijela), 2 mL 3-aminopropan-1-ola, 8 mL ledene octene kiseline i 50 mL vode. Dopuni se do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela). Ovaj je reagens stabilan tjedan dana.

3.3. Otapalo B: U graduiranu tikvicu volumena 100 mL pipetom se prenese 2 mL 3-aminopropan-1-ola i 10 mL ledene octene kiseline. Ohladi se na sobnu temperaturu i dopuni do oznake N,Ndimetilformamidom. Ovaj je reagens stabilan tjedan dana.

3.4. Anilin: Ako optička gustoća u slijepoj probi prelazi 0,022, anilin se destilira iznad cinka u prahu, pri čemu se odbaci prva i zadnja frakcija od 10% destilata. Ako se reagens drži u hladnjaku u zatvorenoj posudi od smeđeg stakla, može se održati nekoliko mjeseci.

3.5. Standardna otopina gosipola A: U graduiranu tikvicu volumena 250 mL doda se 27,9 mg gosipol acetata. Otopi se i dopuni otapalom A (točka 3.2. ovoga Dijela) do oznake. Pipetom se prenese 50 mL te otopine u graduiranu tikvicu volumena 250 mL i dopuni otapalom A do oznake. Koncentracija gosipola u toj otopini iznosi 0,02 mg/mL. Prije uporabe otopina se ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi.

3.6. Standardna otopina gosipola B: U graduiranu tikvicu volumena 50 mL doda se 27,9 mg gosipol acetata. Otopi se i dopuni otapalom B (točka 3.3. ovoga Dijela) do oznake. Koncentracija gosipola u toj otopini iznosi 0,5 mg/mL.

Ako se zaštite od svjetla, standardne su otopine gosipola A i B stabilne 24 sata.

4. Oprema

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

4.2. Spektrofotometar

5. Postupak

5.1. *Testni uzorak*

Količina korištenog testnog uzorka ovisi o očekivanom udjelu gosipola u uzorku. Poželjno je koristiti mali testni uzorak i relativno velik alikvotni dio fi ltrata tako da se dobije dovoljna količina gosipola za točna fotometrijska mjerenja. Kod određivanja slobodnog gosipola u sjemenu, brašnu i pogači od pamukovog sjemena količina testnog uzorka ne prelazi 1 g; za krmnu smjesu količina može biti do 5 g. U većini je primjera prikladan alikvotni dio fi ltrata od 10 mL; isti sadrži 50 – 100 µg gosipola. Kod određivanja ukupnog gosipola, testni uzorak iznosi 0,5 – 5 g, tako da alikvotni dio fi ltrata od 2 mL sadrži 40 – 200 µg gosipola.

Analiza se provodi na sobnoj temperaturi od približno 20 °C.

5.2. *Određivanje slobodnog gosipola*

Testni se uzorak prenese u tikvicu s brušenim vratom volumena 250 mL, čije je dno prekriveno drobljenim staklom. Pipetom se doda 50 mL otapala A (točka 3.2. ovoga Dijela), tikvica se zatvori i miješa jedan sat u miješalici. Filtrira se kroz suhi fi ltar i fi ltrat prikupi u maloj tikvici s brušenim vratom. Tijekom fi ltriranja lijvak se prekrije satnim staklom.

Pipetom se u obje građuirane tikvice volumena 25 mL (A i B) prenese jednaki alikvotni dijelovi fi ltrata, koji sadrže 50 – 100 µg gosipola. Po potrebi se dopuni otapalom A (točka 3.2. ovoga Dijela) do 10 mL. Tikvica (A) se do oznake dopuni smjesom propan-2-olheksana (točka 3.1. ovoga Dijela). Ova se otopina koristi kao referentna otopina za mjerenje otopine uzorka.

Pipetom se u obje građuirane tikvice volumena 25 mL (C i D) prenese 10 mL otapala A (točka 3.2. ovoga Dijela). Dopuni se do

STRANICA 50 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

pri čemu je:

E = korigirana optička gustoća određena sukladno točki 5.2.

ovoga Dijela;

p = masa testnog uzorka u g;

a = alikvotni dio fi ltrata u mL

6.2. *Iz kalibracijske krivulje*

6.2.1. *Slobodni gosipol*

Pripreme se 2 serije po pet građuiranih tikvica volumena 25 mL. U svaku seriju tikvica pipetom se prenese alikvoti od 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10,0 mL standardne otopine gosipola A (točka 3.5. ovoga Dijela). Otapalom A (točka 3.2. ovoga Dijela) se dopune volumeni do 10 mL. Zadnja građuirana tikvica volumena 25 mL u svakoj seriji sadrži samo 10 mL otapala A (točka 3.2. ovoga Dijela) (slijepa proba).

Tikvice iz prve serije (uključujući tikvicu za slijepu probu) dopune se do 25 mL smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela) (referentna serija).

U svaku tikvicu iz druge serije (uključujući tikvicu za slijepu

probu) doda se 2 mL anilina (točka 3.4. ovoga Dijela). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-olheksana (točka 3.1. ovoga Dijela), homogenizira i ostavi stajati jedan sat (standardna serija).

Optička gustoća otopina iz standardne serije i odgovarajućih otopina iz referentne serije odredi se sukladno točki 5.2. ovoga Dijela. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće nasuprot količine gosipola (u μg).

6.2.2. *Ukupni gosipol*

Pripremi se šest graduiranih tikvica volumena 50 mL. U prvu se tikvicu prenese 10 mL otapala B (točka 3.3. ovoga Dijela), a u druge 2,0; 4,0; 6,0, 8,0 i 10,0 mL standardne otopine gosipola B (točka 3.6. ovoga Dijela). Svaka se tikvica dopuni do 10 mL otapalom B (točka 3.3. ovoga Dijela). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol– heksana (točka 3.1. ovoga Dijela) i homogenizira.

Prenese se po 2,0 mL svake od navedenih otopina u svaku od dvije serije po šest graduiranih tikvica volumena 25 mL. Tikvice iz prve serije dopune se do 25 mL smjesom propan-2-ol– heksana (točka 3.1. ovoga Dijela) (referentna serija).

U svaku tikvicu iz druge serije doda se 2 mL anilina (točka 3.4. ovoga Dijela). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela), homogenizira i ostavi stajati jedan sat (standardna serija).

Optička gustoća otopina iz standardne serije i odgovarajućih otopina iz referentne serije odredi se sukladno točki 5.2. ovoga Dijela. Kalibracijska se krivulja pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustoće nasuprot količine gosipola (u μg).

6.3. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio gosipola manji od 500 ppm,
- 75 ppm, apsolutne vrijednosti za udio gosipola od 500 – 750 ppm,
- 10% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio gosipola veći od 750 ppm.

oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela) Tikvica

(C) se do oznake dopuni smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela). Ova se otopina koristi kao referentna otopina za mjerenje otopine slijepe probe.

U tikvice (D) i (B) se doda 2 mL anilina (točka 3.4. ovoga Dijela).

Grije se 30 minuta nad vrelom vodenom kupelji, do obojenja.

Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela), homogenizira i ostavi stajati jedan sat.

Optička gustoća otopine iz slijepe probe (D) odredi se usporedbom s referentnom otopinom (C), a optička gustoća otopine uzorka (B) usporedbom s referentnom otopinom (A) u spektrofotometru na 440 nm sa staklenim kivetama veličine 1 cm.

Oduzme se optička gustoća otopine slijepe probe od optičke gustoće otopine uzorka (= korigirana optička gustoća). Iz ove se vrijednosti izračunava udio slobodnog gosipola, sukladno točki 6. ovoga Dijela.

5.3. *Određivanje ukupnog gosipola*

U graduiranu se tikvicu volumena 50 mL prenese testni uzorak s 1 – 5 mg gosipola i doda 10 mL otapala B (točka 3.3. ovoga Dijela). Istovremeno se pripremi slijepa proba, tako da se u drugu graduiranu tikvicu volumena 50 mL prenese 10 mL otapala B (točka 3.3. ovoga Dijela). Obje se tikvice griju 30 minuta iznad vrele vodene kupelji. Ohladi se na sobnu temperaturu, obje se tikvice dopune do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela). Homogenizira se i ostavi stajati 10 – 15 minuta da se istaloži, zatim se fi ltrira u tikvicu s brušenim vratom.

U dvije se graduirane tikvice volumena 25 mL pipetom prenese po 2 mL fi ltrata uzorka, a u druge dvije graduirane tikvice volumena 25 mL po 2 mL fi ltrata slijepe probe. Po jedna se tikvica iz svake serije dopuni do 25 mL smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela). Ove se otopine koriste kao referentne otopine.

U svaku od preostalih tikvica doda se 2 mL anilina (točka 3.4. ovoga Dijela). Zagrijava se 30 minuta iznad vrele vodene kupelji do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnu temperaturu, dopuni smjesom propan-2-ol-heksana (točka 3.1. ovoga Dijela) do 25 mL, homogenizira i ostavi stajati jedan sat.

Optička gustoća slobodnog gosipola određuje se sukladno točki 5.2. ovoga Dijela. Iz ove se vrijednosti izračunava udio ukupnog gosipola, sukladno točki 6. ovoga Dijela.

6. Izračun rezultata

Rezultati se mogu izračunati bilo iz specifične optičke gustoće (točka 6.1. ovoga Dijela) ili iz kalibracijske krivulje (točka 6.2. ovoga Dijela).

6.1. Iz specifične optičke gustoće

Specifične optičke gustoće, pri opisanim uvjetima, su sljedeće:

Slobodni gosipol:

Ukupni gosipol:

Udio slobodnog ili ukupnog gosipola u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

% gosipola: :

2. Sukladnost serije (*engl. lot*) ili podserije (*engl. sublot*) sa specifikacijom

Serija se prihvaća ako rezultat pojedinačne analize ne prelazi određenu najvišu dopuštenu količinu određenu Pravilnika o nepoželjnim tvarima⁵ uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Serija nije sukladna najvišoj dopuštenoj količini određenoj Pravilnikom o nepoželjnim tvarima⁵ ako rezultat analize zaokružen nagore¹⁴, potvrđen dvostrukom analizom¹⁵, izvan razumne sumnje prelazi najvišu dopuštenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Mjerna nesigurnost uzima se u obzir sukladno jednom od sljedećih pristupa:

- izračun proširene nesigurnosti uz uporabu obuhvatnog faktora 2, čime se postiže razina pouzdanosti od 95%. Serija nije sukladna ako je izmjerena vrijednost minus U iznad najviše vrijednosti. Kod postupka odvojenog određivanja dioksina i dioksinu sličnih PCB-a, za zbroj dioksina i dioksinu sličnih PCB-a koristi se zbroj procijenjene proširene nesigurnosti odvojenih analitičkih rezultata dioksina i dioksinu sličnih PCB-a;
- utvrđivanjem granične koncentracije (količine) analita (CC α) sukladno Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (*» Narodne novine*«, broj 2/2005)¹⁶ (točka 2.1.2.5 Priloga II. – u slučaju tvari s utvrđenom najvišom dopuštenom količinom). Serija nije sukladna ako je izmjerena vrijednost jednaka ili veća od CC α .

Sadašnja pravila tumačenja primjenjuju se na rezultat analize uzorka za službenu kontrolu.

Glava II.

PRIPREMA UZORKA I ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE KOD SLUŽBENE KONTROLE RAZINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I DIOKSINU SLIČNIH PCB-a

1. Svrha i područje primjene

Ovi se zahtjevi primjenjuju kada se krmiva i hrana za životinje analiziraju za određivanje količine dioksina (polikloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF)) te polikloriranih dioksinu sličnih bifenila (PCB).

Monitoring prisutnosti dioksina u hrani za životinje može se provoditi strategijom temeljenoj na orijentacijskoj (*engl. screening*) metodi za odabir uzoraka u kojima razine dioksina i dioksinu sličnih PCB-a prelaze značajnu vrijednost ili su od nje manje za najviše 25%. Koncentracija dioksina u uzorcima sa značajnim razinama treba se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

Orijentacijske metode su metode koje se koriste za otkrivanje prisutnosti značajnih vrijednosti dioksina i dioksinu sličnih PCB-a.

Ovim se metodama može analizirati velik broj uzoraka i upotrebljavaju se za probiranje velikog broja uzoraka s mogućim pozitivnim rezultatima analize. Ove se metode posebno osmišljavaju kako bi se izbjegla mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata.

¹⁵ Dvostuka je analiza potrebna kako bi se isključila mogućnost unutarnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Prva se analiza, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost, koristi za potvrdu sukladnosti.

Ako se analiza provodi u sklopu incidenta sa kontaminacijom dioksinom, potvrda s dvostrukom analizom može se izostaviti kada su uzorci odabrani za analizu sljedeći do incidenta sa kontaminacijom dioksinom.

¹⁶ Pravilnikom su preuzete odredbe Odluke Komisije 2002/657/EZ od 12. kolovoza 2002. godine kojom se primjenjuje Direktiva Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata.

Dio B.

ODREĐIVANJE RAZINE DIOKSINA (PCDD/PCDF) I DIOKSINU SLIČNIH PCB-a

Glava I.

METODE UZORKOVANJA I TUMAČENJE REZULTATA ANALIZE

1. Svrha i opseg primjene

Uzorci za službenu kontrolu razine dioksina (polikloriranih dibenzo-

p-dioksina (PCDD) i polikloriranih dibenzofurana (PCDF))
te dioksinu sličnih polikloriranih bifenila (PCB)₁₃ u hrani za životinje
uzimaju se sukladno odredbama Priloga I. ovoga Pravilnika.
Primjenjuju se količinski zahtjevi za kontrolu tvari ili proizvoda
ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje kako je predviđeno
točkom 5.A. Priloga I. ovoga Pravilnika. Skupni uzorci dobiveni na
taj način smatraju se reprezentativnim za serije i podserije iz kojih
su uzeti. Sukladnost s najvišim dopuštenim količinama određenim
Pravilnika o nepoželjnim tvarima⁵, utvrđuje se temeljem količina
utvrđenih na laboratorijskim uzorcima.

*Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za doksine, furane i
dioksinu slične PCB-e¹⁴*

Kongeneri Vrijednost

TEF

Kongeneri Vrijednost

TEF

Dibenzo-p-dioksini

(» PCDD-i «)

Dioksinu slični

PCB-i:

2,3,7,8-TCDD 1

1,2,3,7,8-PeCDD 1 Ne-orto PCB-i

1,2,3,4,7,8-HxCDD 0,1 PCB 77 0,0001

1,2,3,6,7,8-HxCDD 0,1 PCB 81 0,0001

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 0,01

OCDD 0,0001 Mono-orto PCB-i

PCB 105 0,0001

Dibenzofurani

(» PCDF «)

PCB 114 0,0005

2,3,7,8-TCDF 0,1 PCB 118 0,0001

1,2,3,7,8-PeCDF 0,05 PCB 123 0,0001

2,3,4,7,8-PeCDF 0,5 PCB 156 0,0005

1,2,3,4,7,8-HxCDF 0,1 PCB 157 0,0005

1,2,3,6,7,8-HxCDF 0,1 PCB 167 0,00001

1,2,3,7,8,9-HxCDF 0,1 PCB 189 0,0001

2,3,4,6,7,8-HxCDF 0,1

1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 0,01

1,2,3,4,7,8,9-HpCDF 0,01

OCDF 0,0001

Korištene kratice: »T« = tetra; »Pe« = penta; »Hx« = hekso; »Hp« = hepta;
»O« = okta; »CDD« = klordibenzo-p-dioksin; »CDF« = klordibenzofuran;
»CB« = klorbifenil.

¹³ Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za dioksine, furane i dioksinu slične PCB-e – *vidi ispred u tekstu*

¹⁴ Pojam »zaokruženo na više« zahtijeva uporabu granice kvantifikacije za doprinos svakog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

Pojam »zaokruženo na dolje« zahtijeva uporabu nule za doprinos svakog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

Pojam »zaokruženo prema sredini« zahtijeva uporabu polovice granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

STRANICA 52 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

– Laboratorije akreditira tijelo za akreditaciju koje djeluje sukladno ISO Uputama 58, čime se jamči da laboratoriji u analizama provode mjere osiguranja kvalitete. Laboratoriji se akreditiraju sukladno normi HR EN ISO/IEC 17025.

5. Zahtjevi za analitičke postupke za dioksine i dioksinu slične PCB-e

Osnovni zahtjevi za prihvaćanje analitičkih postupaka:

- Visoka osjetljivost i niske granice detekcije. Za PCDD-e i PCDF-e, detektibilne količine moraju biti u području pikograma TEQ (10⁻¹² g) zbog visoke toksičnosti nekih od navedenih spojeva. Poznato je kako se PCB-i pojavljuju u većim količinama od PCDD-a i PCDF-a. Za većinu kongenera PCB-a dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10⁻⁹ g). Međutim, za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-a (osobito ne-orto supstituiranih kongenera) treba postići jednaku osjetljivost kao kod PCDD-a i PCDF-a;
- Visoka selektivnost (specifičnost). Potrebno je razlikovati između PCDD-a, PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahiranih i vjerojatno interferentnih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC/MS) nužno je razlikovati između različitih kongenera, na primjer između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD-a i PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a) i

drugih kongenera. Biotestovi moraju omogućiti selektivno određivanje vrijednosti TEQ kao sume PCDD-a, PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a;

– Visoka točnost (istinitost i preciznost). Postupak određivanja mora dati valjane i pouzdane procjene stvarne koncentracije u uzorku. Potrebna je visoka točnost (točnost mjerenja: suglasnost između rezultata mjerenja sa stvarnom ili dogovorenom vrijednosti mjerene veličine) kako bi se spriječilo odbacivanje rezultata analize uzorka na temelju slabe pouzdanosti procjene TEQ. Točnost se iskazuje kao istinitost (razlika između srednje vrijednosti koja je izmjerena za analit u certifi ciranom materijalu i njegove certifi cirane vrijednosti, iskazano kao postotak te vrijednosti) i preciznost (RSD_R , relativna standardna devijacija dobivena iz rezultata pod uvjetima obnovljivosti). Orijentacijske metode mogu uključivati biotestove i GC/MS metode; potvrdne metode su metode visoko djelatne plinske kromatografije/ visoko djelatne masene spektrometrije (HRGC/HRMS). Za ukupnu vrijednost TEQ moraju se ispuniti sljedeća mjerila:

Orijentacijske

metode

Potvrdne metode

Udjel lažno negativnih
rezultata

< 1%

Istinitost – 20% do + 20%

Preciznost RSD_R < 30% < 15%

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati GC/MS metode

koje se koriste u svrhu orijentacije ili potvrde

– Pri vrednovanju analitičke metode, unutarnji standardi PCDD/F-ova supstituirani klorom na položaju 2, 3, 7, 8 i obilježeni izotopom ^{13}C i unutarnji standardi dioksinima slični PCB-i obilježeni izotopom ^{13}C moraju se dodati na samom početku analitičkog postupka, npr. prije ekstrakcije. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-klorirane homologne skupine za PCDD/F-a i najmanje po jedan kongener za sve homologne skupine. Potvrdne metode su metode koje daju potpune ili dodatne informacije putem kojih se mogu identifi cirati i točno kvantitativno odrediti dioksini i dioksinu slični PCB-i na razini značajne vrijednosti.

2. Kontekst primjene

Budući da uzorci iz okoliša i biološki uzorci (uključujući uzorke krmiva/hrane za životinje) općenito sadrže kompleksne smjese različitih

kongenera dioksina razvijen je koncept faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) kako bi se olakšala procjena opasnosti. TEF-ovi su uvedeni za iskazivanje koncentracija smjesa 2; 3; 7; 8-supstituiranih PCDD-a i PCDF-a i nekih ne-orto i mono-orto klor-supstituiranih PCB-a s djelovanjem sličnim dioksinu u ekvivalentima toksičnosti (TEQ) 2; 3; 7; 8-TCDD-a. Koncentracije pojedinačnih tvari u danom uzorku pomnože se s odgovarajućim TEF-om i zatim zbroje kako bi se dobila ukupna koncentracija spojeva sličnih dioksinu iskazana u ekvivalentima toksičnosti.

Isključivo za potrebe ovoga Pravilnika, prihvatljiva specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera je koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi odziv instrumenta na dva različita iona koji se prate s omjerom S/Š (signal/šum) (*engl. S/N signal/noise*) 3:1 za manje osjetljiv signal i ispunjavanje temeljnog zahtjeva, npr. vrijeme retencije i omjer izotopa sukladno postupku određivanja opisanom u EPA-inoj metodi 1613, revizija B.

3. Zahtjevi za osiguranje kvalitete kojima treba udovoljiti tijekom pripreme uzorka

Primjenjuju se opće odredbe za pripremu uzoraka za analizu iz Priloga II. ovoga Pravilnika.

Osim toga treba udovoljiti i sljedećim zahtjevima:

- uzorke treba čuvati i prenositi u staklenim, aluminijskim, polipropilenskim ili polietilenskim posudama. Iz posude za uzorke treba odstraniti tragove papirne prašine. Staklene se posude ispiru otapalima koja su prethodno provjerena na prisutnost dioksina;
- slijepa proba se vrši tako da se provede cjelokupan analitički postupak, ali bez uzorka;
- masa uzorka koji se koristi za ekstrakciju mora biti dovoljna da ispunjava zahtjeve glede osjetljivosti.

4. Zahtjevi za laboratorije

- Laboratoriji trebaju prikazati učinkovitost metode u području značajne vrijednosti, npr. na razini jednako 0,5x, 1x i 2x značajne vrijednosti s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize. Za detalje o mjerilima prihvatljivosti vidi točku 5. ovoga Dijela.
- Granica kvantifikacije za potvrđnu metodu ne bi trebala prijeći jednu petinu značajne vrijednosti kako bi se u području razmatrane vrijednosti osigurali prihvatljivi koeficijenti varijacije.
- Redovite slijepa kontrole i pokusi s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni

materijal) provode se kao mjere interne kontrole kvalitete.

– Najbolji je način kojim laboratorij dokazuje stručnost u provođenju određenih analiza uspješno sudjelovanje u međulaboratorijskom određivanju za ocjenu stručnosti laboratorija. Uspješno sudjelovanje u međulaboratorijskom određivanju, npr. za uzorke tla ili otpadnih voda, ipak ne dokazuje nužno stručnost na području uzoraka hrane ili hrane za životinje u kojima se susreću niže razine kontaminacije. Zbog toga je obvezno stalno sudjelovanje u međulaboratorijskim određivanjima za određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-a u mjerodavnim matricama hrane za životinje/hrane.

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 53

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

- Za potvrdu učinkovitosti testa u značajnom području radi provjere značajne vrijednosti koriste se dodatni referentni uzorci u kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od značajne vrijednosti.
- Za ispitivanje ostalih matriksa potrebno je dokazati prikladnost jednog ili više referentnih uzoraka, najbolje uključivanjem uzoraka za koje je HRGC/HRMS analiza pokazala da sadrže TEQ u razini referentnoga uzorka ili tako da se slijeпа проба obogati standardom na toj razini.
- Budući da se u biotestovima ne mogu koristiti interni standardi, vrlo su važna ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar jedne serije ispitivanja. Koefi cijent varijacije mora biti manji od 30%.
- U primjeni biotestova moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive razine za slijepe probe.

Kvantitativni pristup

Kvantitativni pristup zahtijeva seriju razrijeđenih standarda, dvostruko ili trostruko pročišćavanje i mjerenje te kontrolu slijepe probe i iskorištenja. Rezultat se može iskazati kao TEQ, čime se pretpostavlja da spojevi odgovorni za signale odgovaraju načelu TEQ-a.

U tu se svrhu može koristiti TCDD (ili standardna smjesa dioksina/furana/dioksinima sličnih PCB-a) kako bi se dobila kalibracijska krivulja za izračun razine TEQ-a u ekstraktu i u uzorku. Rezultat razine TEQ-a se naknadno korigira za vrijednost slijepe probe (kako bi se isključio utjecaj nečistoća koje potječu iz korištenih otapala i

kemikalija) i za iskorištenje (izračunato u kontroli kvalitete uzorka iz razine TEQ-a koja je približna odgovarajućoj razini interesa). Važno je napomenuti kako na smanjenje iskorištenja dijelom može utjecati matriks efekt i/ili razlike između vrijednosti TEF-a iz biotestova i službenih vrijednosti TEF-a koje je odredila Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation – WHO*).

7.2 Zahtjevi za orijentacijske analitičke metode

- Za orijentaciju se mogu koristiti analitičke GC/MS metode i biotestovi. Za GC/MS metode primjenjuju se zahtjevi navedeni u točki 6. ove Glave. Posebni zahtjevi za stanične biotestove navedeni su u točki 7.3. ove Glave, a za biotestove u kitu u točki 7.4. ove Glave.
- Potrebno je dobiti podatke o broju lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata iz velikog broja uzoraka s količinama ispod ili iznad najviše dopuštene količine ili razine postupanja u odnosu na udio TEQ-a utvrđen potvrđnom analitičkom metodom. Stvarni udio lažno negativnih uzoraka mora biti manji od 1%. Udio lažno pozitivnih uzoraka mora biti dovoljno nizak da orijentacijska metoda bude prihvatljiva.
- Pozitivni rezultati uvijek se moraju potvrditi potvrđnom analitičkom metodom (HRGC/HRMS). Dodatno, uzorci iz širokog raspona TEQ vrijednosti potvrđuju se HRGC/HRMS (približno od 2 do 10% negativnih uzoraka). Treba omogućiti dostupnost podataka o odnosu rezultata dobivenih biotestom i HRGC/HRMS metodom.

7.3. Posebni zahtjevi za stanične biotestove

- Kod provedbe biotesta, za svaku je seriju određenoga biotesta potreban niz referentnih koncentracija TCDD-a ili smjese dioksina/furana (čitava krivulja odgovora na dozu pri $R_2 > 0,95$). Međutim, za potrebe orijentacijske metode, kod analize uzoraka s niskim koncentracijama može se upotrijebiti proširena krivulja za niže razine.
- Na kontrolnoj karti kvalitete moraju se prikazati rezultati biotesta kroz određeno neprekinuto razdoblje za referentnu koncentraciju TCDD-a (približno trostruka granica kvantifikacije). Umjesto toga, može se koristiti relativan odgovor referentnoga uzorka u odnosu na kalibracijski pravac za TCDD, budući da stanični odgovor može ovisiti o mnogo čimbenika.

ne za dioksinima slične PCB-e (ili najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/F-ova odnosno dioksinu sličnih PCB-a). Najbolje je koristiti, osobito za potvrdne metode, svih 17 unutarnjih standarda PCDD/F-ova supstituiranih na položajima 2, 3, 7, 8 i obilježenih izotopom ^{13}C i

svih 12 unutarnjih standarda dioksinima sličnih PCB-a obilježenih izotopom ^{13}C .

- Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje analog obilježen izotopom ^{13}C , tako što će se koristiti odgovarajuće kalibracijske otopine.

- Za hranu biljnog i životinjskoga podrijetla koja sadrži manje od 10% masti, interni se standardi obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskoga podrijetla u kojoj je udjel masti veći od 10%, interni se standardi mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrednovanje učinkovitosti ekstrakcije, ovisno o fazi u kojoj se interni standardi dodaju, te o tome iskazuju li se rezultati na cijeli uzorak ili na udio masti u uzorku.

- Prije analize GC/MS treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.

- Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode iskorištenje pojedinačnih internih standarda mora biti između 60% i 120%. Prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-klorirane dibenzodioksine i dibenzofurane, pod uvjetom da je njihov doprinos vrijednosti TEQ manji od 10% ukupne vrijednosti TEQ (dobivene na temelju zbroja PCDD/F-ova i dioksinima sličnih PCB-a). Za orijentacijske metode iskorištenje mora biti između 30% i 140%.

- Dioksini se od kloriranih spojeva koji mogu interferirati u analizi, poput PCB-a koji nisu slični dioksinu te kloriranih difenil etera, odvajaju odgovarajućim kromatografskim tehnikama (najbolje pomoću kolone s f1 orisilom, aluminijevim oksidom i/ili aktivnim ugljenom).

- Razdvajanje izomera plinskom kromatografijom mora biti zadovoljavajuće (preklapanje signala 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF i signala 1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF < 25% od pika do pika).

- Tetra do okta-klorirani dioksini i furani određuju se sukladno EPA-inoj metodi 1613, revizija B, metodom izotopnog razrjeđenja uz primjenu HRGC/HRMS-a odnosno drugom metodom s ekvivalentnim kriterijima učinkovitosti.

- Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20% za hranu za životinje u kojoj je kontaminacija dioksinima u području oko ili iznad najviše vrijednosti. Za hranu za životinje u kojoj je kontaminacijska razina osjetno ispod najviše vrijednosti, razlika može biti u području od 25% – 40%.

7. Orijentacijske analitičke metode

7.1 Uvod

Različiti analitički pristupi mogu se primijeniti za orijentacijske metode: samo orijentacijski pristup i kvantitativni pristup.

Orijentacijski pristup

Rezultati analize uzoraka uspoređuju se s rezultatima referentnog uzorka. Uzorci čiji su rezultati manji od rezultata referentnog uzorka smatraju se negativnima, a oni s većim rezultatima su sumnjivo pozitivni. Zahtjevi su sljedeći:

– Uz svaku seriju uzoraka mora se analizirati slijepa proba i referentni uzorak/ci koji se ekstrahiraju i analiziraju pod identičnim uvjetima. Rezultat referentnog uzorka mora nedvojbeno biti veći od rezultata slijepe probe.

Ako se nesigurnost mjerenja računa iz granične koncentracije analita CC α (kako je opisano u točki 2. Glavi I. ovoga Dijela B) tada se mora navesti i taj parametar.

PRILOG VI.

ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA ZA SLUŽBENU KONTROLU HRANE ZA ŽIVOTINJE UVJETI ZA MIKROSKOPSKU DETEKCIJU, IDENTIFIKACIJU ILI PROCJENU SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA U HRANI ZA ŽIVOTINJE

1. Cilj i područje primjene

Ovi se uvjeti primjenjuju kada se utvrđivanje sastojaka životinjskog podrijetla (određenih kao proizvodi iz prerade trupa ili dijelova tijela sisavaca, peradi i riba) u hrani za životinje provodi mikroskopskim pregledom u okviru koordiniranog programa inspekcije u području hranidbe životinja sukladno Pravilniku o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje, te propisa o zdravlju i zaštiti životinja (» Narodne novine « broj 99/07 i 74/08)¹⁷.

Ako se u svim službenim testovima koriste metode iz ovog Priloga, mogu se provesti i dodatni testovi koji se temelje na izmijenjenoj

ili drugoj metodi kako bi se poboljšala detekcija određenih vrsta sastojaka životinjskog podrijetla ili za detaljnije određivanje izvora sastojaka životinjskog podrijetla. Osim toga, kod pregledavanja nekih posebnih sastojaka životinjskog podrijetla, poput plazme ili kosti u loju (vidi također točku 9. ovoga Priloga) može se koristiti inačica protokola pod uvjetom da se navedene analize provode dodatno uz analize predviđene usklađenim programom inspekcije.

2. Osjetljivost

Ovisno o vrsti sastojaka životinjskog podrijetla, u hrani za životinje mogu se detektirati vrlo male razine ($< 0,1\%$).

3. Načelo

Za identifikaciju se koristi reprezentativni uzorak, uzet sukladno odredbama Priloga I. ovoga Pravilnika te pripremljen na primjeren način. Za obradu hrane za životinje s niskim udjelom vode primjeren je sljedeći protokol. Prije obrade se hrana za životinje sa udjelom vode većim od 14% osuši (kondenzira). Posebne vrste hrane za životinje ili krmiva (npr. masti, ulja) treba namjenski obraditi (vidi točku 9. ovoga Priloga). Sastojci životinjskog podrijetla utvrđuju se na temelju tipičnih, mikroskopski prepoznatljivih karakteristika (tj. mišićnih vlakana i ostalih dijelova mesa, hrskavice, kosti, rogova, dlake, čekinja, krvi, perja, ljuske jaja, ribljih kosti, ljusaka). Identifikacija se mora izvršiti na prosijanoj frakciji (točka 6.1. ovoga Priloga) i koncentriranom talogu (točka 6.2. ovoga Priloga) uzorka.

4. Reagensi

4.1. Sredstvo za pripremu preparata

4.1.1. Kloral-hidrat (vodeni, 60% w/v)

4.1.2. Lužina (NaOH 2,5% w/v ili KOH 2,5% w/v) za prosijane frakcije

¹⁷ Pravilnikom su preuzete odredbe Uredbe (EZ) br. 882/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. godine o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje, te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja.

– Dijagrami kontrole kvalitete za svaki tip referentnoga materijala bilježe se i provjeravaju kako bi se osigurao rezultat sukladan navedenim smjernicama.

– Posebno kod kvantitativnih izračuna, razrijeđenost uzorka mora biti u linearnom području odzivne krivulje. Uzorci s odgovorom iznad linearnog područja odzivne krivulje moraju se razrijediti i ponovo testirati. Stoga valja istodobno testirati najmanje tri ili više razrjeđenja.

- Postotak standardne devijacije ne smije biti veći od 15% pri trostrukom određivanju za svako razrjeđenje uzorka, niti smije biti veći od 30% između tri neovisna testiranja.
- Granica detekcije može biti tri puta veća od standardne devijacije za otopinu slijepe probe odnosno od pozadinskog šuma. Drugi je pristup primjena odgovora višeg od pozadinskoga šuma (faktor indukcije 5x slijepa proba otapala) koji se izračunava iz kalibracijske krivulje za taj dan. Granica kvantifikacije može biti postavljena kao 5 – 6 puta veća od standardne devijacije u odnosu na slijepu probu otapala ili od pozadinskog šuma, odnosno može se primijeniti odgovor koji je neupitno veći od pozadinskoga šuma (faktor indukcije 10x slijepa proba otapala) koji se izračunava iz kalibracijske krivulje za taj dan.

7.4. Posebni zahtjevi za biotestove u kitu

- Potrebno je osigurati dovoljnu osjetljivost i pouzdanost biotestova u kitu kada se primjenjuju za hranu za životinje.
- Za pripremu uzorka i analize treba slijediti upute proizvođača.
- Testni kitovi ne smiju se rabiti nakon isteka roka valjanosti.
- Ne smiju se rabiti materijali i sastojci namijenjeni uporabi s drugim kompletima.
- Testni se kitovi čuvaju na određenom rasponu temperatura te se rabe na određenoj radnoj temperaturi.
- Granica detekcije za imunotestove određuje se kao suma srednje vrijednosti i trostruke standardne devijacije, a na temelju 10 ponovljenih analiza slijepe probe, koja se dijeli s nagibom krivulje u jednadžbi linearne regresije.
- Za laboratorijsko testiranje moraju se koristiti referentni standardi koji osiguravaju odgovor standarda u prihvatljivom području.

8. Izvješća o ispitivanju

Ovisno o korištenom analitičkom postupku, podaci koje izvješće o ispitivanju mora sadržavati su razine pojedinačnih kongenera PCDD/F-a i PCB-a, a analitički rezultati trebaju biti navedeni kao veće, manje ili srednje, kako bi se uključila maksimalna količina podataka u izvješća o rezultatima i omogućilo tumačenje rezultata sukladno posebnim zahtjevima.

U izvještaj mora biti uključen udio masti u uzorku kao i metoda ekstrakcije masti.

Iskorištenja pojedinih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u točki 6. ove Glave, u slučaju da je dobiveni rezultat veći od najveće dopuštene razine te u

drugim slučajevima na poseban zahtjev.

Pri odluci o sukladnosti uzorka u obzir treba uzeti mjernu nesigurnost koja mora biti dostupna. Rezultati analize se prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost uz faktor obuhvata 2, čime se dobiva razina pouzdanosti od oko 95%. Određuju li se dioksini odvojeno od dioksinima sličnih PCB-a, tada se zbrajaju procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza dioksina i dioksinima sličnih PCB-a, korištene za sumu dioksina i dioksinu sličnih PCB-a.

PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 55

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

različitim povećanjima kako bi se detektirali sastojci životinjskog podrijetla.

Mikroskopski preparati iz prosijanih frakcija sa sitnim česticama sustavno se pregledavaju mikrobiološkim sastavljenim mikroskopom (točka 5.6. ovoga Priloga) pod različitim povećanjima kako bi se detektirali sastojci životinjskog podrijetla.

6.2. Identifikacija sastojaka životinjskog podrijetla u koncentriranom talogu

U lijevke za odjeljivanje ili posudu s konusnim dnom za taloženje prenese se najmanje 5 g (s preciznošću od 0,01 g) uzorka i obradi s najmanje 50 mL tetrakloretilena (točka 4.3.1. ovoga Priloga). Smjesa se više puta promućka ili promiješa.

– Ako se koristi zatvoreni lijevak za odjeljivanje, otopina se ostavi stajati dovoljno dugo (najmanje 3 minute) prije odvajanja taloga.

Više puta se promućka i otopina ponovo ostavi stajati najmanje 3 minute. Ponovo se odvoji talog.

– Ako se koristi otvorena čaša, otopina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga.

Cjelokupni talog se osuši i zatim izvaže (s preciznošću od 0,001 g). Vaganje je potrebno samo kada se zahtijeva procjena. Ako se talog sastoji od velikog broja krupnijih čestica, može se prosijati kroz sito (točka 5.3. ovoga Priloga) u dvije frakcije. Osušeni se talog pregleda pod stereomikroskopom (točka 5.5. ovoga Priloga) i mikrobiološkim sastavljenim mikroskopom (točka 5.6. ovoga Priloga) kako bi se detektirali strukturni dijelovi kosti.

6.3. Uporaba sredstava za pripremu preparata i reagensa za bojanje

Mikroskopska identifikacija sastojaka životinjskog podrijetla može biti potpomognuta posebnim sredstvima za pripremu preparata i reagensima za bojanje.

Kloral hidrat (točka 4.1.1. ovoga Priloga): Uz oprezno zagrijavanje stanične se strukture vide bolje zato što se škrobna zrnca želatiniziraju, a nepoželjni sastojci stanice uklone.

Lužina (točka 4.1.2. ovoga Priloga): Uzorak hrane za životinje očisti se natrijevim hidroksidom ili kalijevim hidroksidom, što olakšava detekciju mišićnih vlakana, dlake i drugih keratinskih struktura.

Parafinsko ulje i glicerol (točka 4.1.3. ovoga Priloga): Strukturni dijelovi kosti mogu se dobro identificirati u tom sredstvu za pripremu preparata zato što je većina koštanih lakuna i dalje ispunjena zrakom koje se vide kao crne rupe veličine približno 5 – 15 µm.

Otopina joda/kalijevog jodida (točka 4.4.1. ovoga Priloga): Koristi se za detekciju škroba (plavo-ljubičasto obojenje) i bjelancevina (žuto-narančasto obojenje). Po potrebi, otopine se mogu razrijediti.

Otopina alizarin crvenila (točka 4.4.2. ovoga Priloga): Crveno/ružičasto obojenje kosti, ribljih kosti i ljusaka. Prije sušenja taloga (vidi točku 6.2. ovoga Priloga), cjelokupni se talog prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere s približno 5 mL alkohola (točka 4.2.1. ovoga Priloga) (svaki se put koristi vrtložna miješalica, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i zatim odlije). Prije uporabe reagensa za bojanje, talog se izbjeli dodavanjem najmanje 1 mL otopine natrijevog hipoklorita (točka 4.5.1. ovoga Priloga). Reakcija se razvija 10 minuta. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi stajati 2 – 3 minute, voda i suspendirane čestice se odliju. Talog se dvaput ispere s 10 mL vode (koristi se vrtložna miješalica, ostavi se istaložiti i svaki se put odlije voda). Doda se 2 – 10 ili više kapi (ovisno o količini ostatka) otopine alizarin crvenila. Smjesa se promućka, reakcija se razvija nekoliko sekundi. Obojani se talog dvaput ispere s približno 5 mL alkohola (točka 4.2.1. ovoga Priloga), zatim 4.1.3. Parafinsko ulje ili glicerol (viskoznost: 68 – 81) za mikroskopsko promatranje taloga

4.2. Sredstva za ispiranje

4.2.1. Alkohol, 96%

4.2.2. Aceton

4.3. Sredstvo za koncentriranje

4.3.1. Tetrakloretilen (gustoća 1,62)

4.4. Reagensi za bojanje

4.4.1. Otopina joda/kalijeveg jodida (otopi se 2 g kalijeveg jodida u 100 mL vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda.)

4.4.2. Alizarin crvenilo (otopi se 2,5 mL 1M kloridne kiseline u 100 mL vode i toj se otopini doda 200 mg alizarin crvenila.)

4.4.3. Cistinski reagens (2 g olovnog acetata, 10 g NaOH/100 mL H₂O)

4.4.4. Otopina joda/kalijeveg jodida (rastopljeno u 70% etanolu)

4.5. Reagens za izbjeljivanje

4.5.1. Komercijalna otopina natrijevog hipoklorita (9,6% aktivnog klora)

5. Oprema i pomagala

5.1. Analitička vaga (preciznost 0,01 g, za koncentrirani talog: 0,001 g)

5.2. Pribor za mljevenje (mlin ili mužar, osobito za hranu za životinje koja kod analize sadrži > 15% masti)

5.3. Sito s mrežicom kvadratnih očica širine najviše 0,50 mm

5.4. Lijevak za odjeljivanje ili posuda s konusnim dnom za taloženje

5.5. Stereomikroskop (najmanje 40x povećanje)

5.6. Mikrobiološki sastavljeni mikroskop (najmanje 400× povećanje), propušteno svjetlo ili polarizirano svjetlo

5.7. Standardno laboratorijsko posuđe od stakla

Sva se oprema mora temeljito očistiti. Lijevci za odjeljivanje i stakleno posuđe trebaju se oprati u stroju za pranje posuđa. Sita se moraju očistiti četkom s tvrdim dlačicama.

6. Postupak

Hrana za životinje u zrnu može se prethodno prosijati ako se obje frakcije analiziraju kao odvojeni uzorci.

Obradi se najmanje 50 g uzorka (po potrebi, oprezno se samelje prikladnom opremom za mljevenje (točka 5.2. ovoga Priloga) kako bi se dobila odgovarajuća struktura). Iz samljevenog se materijala izuzmu dva reprezentativna dijela, jedan za frakciju za prosijavanje (najmanje 5 g) (točka 6.1. ovoga Priloga) i jedan za koncentrirani talog (najmanje 5 g) (točka 6.2. ovoga Priloga). Za identifikaciju se dodatno može primijeniti bojanje s reagensima za bojanje (točka 6.3. ovoga Priloga).

Za utvrđivanje prirode životinjskih bjelančevina i podrijetla čestica, može se koristiti sustav potpore odlučivanja poput ARIES i referentni uzorci mogu biti dokumentirani.

6.1. Utvrđivanje sastojaka životinjskog podrijetla u prosijanim

frakcijama

Kroz sito se prosije najmanje 5 g uzorka (točka 5.3. ovoga Priloga) u dvije frakcije.

Prosijane frakcije s velikim česticama (ili reprezentativni dio frakcije) nanese se u tankom sloju na primjerenu podlogu i sustavno pregledavaju stereomikroskopom (točka 5.5. ovoga Priloga) pod

STRANICA 56 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

cijski faktor (%) za procijenjeni udio ribljih kosti i dijelova ljustica u talogu, f = korekcijski faktor za udio kosti u sastojcima životinjskog podrijetla u pregledanom uzorku, W = masa materijala uzorka za sedimentaciju (mg)).

8. Prikaz rezultata pretraživanja

Izviješće sadrži najmanje podatke o prisutnosti dijelova podrijetlom od kopnenih životinja i ribljeg brašna. O različitim se primjerima izvještava na sljedeći način:

8.1. S obzirom na prisutnost dijelova podrijetlom od kopnenih životinja:

– koliko je moguće utvrditi mikroskopskim pregledom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost dijelova podrijetlom od kopnenih životinja,

ili

– koliko je moguće utvrditi mikroskopskim pregledom, u dostavljenom uzorku je utvrđena prisutnost dijelova podrijetlom od kopnenih životinja.

8.2. i, s obzirom na prisutnost ribljeg brašna:

– koliko je moguće utvrditi mikroskopskim pregledom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost dijelova podrijetlom od ribe,

ili

– koliko je moguće utvrditi mikroskopskim pregledom, u dostavljenom uzorku je utvrđena prisutnost dijelova podrijetlom od ribe.

Kada se utvrdi prisutnost dijelova podrijetlom od ribe ili podrijetlom od kopnenih životinja, u izvješću o rezultatima pretraživanja može se, po potrebi, dodatno navesti procjena razine detektiranih

dijelova ($x\% < 0,1\%$; $0,1 - 0,5\%$; $0,5 - 5\%$ ili $> 5\%$), nadalje utvrditi vrstu kopnene životinje, ako je to moguće, te odrediti dijelove životinjskog podrijetla (mišićna vlakna, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinje, krv, ljuske jaja, riblje kosti, ljuske).

Kada se procjenjuje količina sastojaka životinja, treba navesti korišteni korekcijski faktor f .

Kada se utvrđuju dijelovi kosti kopnenih životinja, izvješće treba sadržavati dodatni navod:

» Ne može se isključiti mogućnost da su gornji dijelovi podrijetlom od sisavaca. «

Takav dodatni navod nije potreban kada su dijelovi kosti kopnenih životinja točno navedeni kao dijelovi kosti peradi ili sisavaca.

9. Alternativni protokol za analizu masti ili ulja

Za analizu masti ili ulja može se koristiti sljedeći protokol:

– Ako je mast u krutom stanju, zagrijava se, na primjer u mikrovalnoj pećnici, dok ne postane tekuća.

– Pipetom se prenese 40 mL masti s dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje.

– Centrifugira se 10 minuta na 4000 okr./min.

– Ako se mast skrutnula nakon centrifugiranja, ponovo se zagrijava u pećnici dok ne postane tekuća. Ponovo se centrifugira 5 minuta na 4000 okr./min.

– Polovica dekantirane nečistoće se prenese malom žličicom ili lopaticom u malu Petrijevu zdjelicu ili na mikroskopsko stakalce za mikroskopsku identifikaciju mogućeg udjela dijelova životinja (mesnih vlakana, perja, dijelova kosti itd.). Kao sredstvo za pripremu preparata za mikroskopiranje preporuča se parafinsko ulje ili glicerol.

jedanput acetonom (točka 4.2.2. ovoga Priloga) (svaki se put koristi vrtložna miješalica, a otapalo se ostavi stajati približno 1 minutu i zatim odlije). Talog je tada spreman za sušenje.

Cistin reagens (točka 4.4.3. ovoga Priloga): Uz oprezno zagrijavanje, sastojci koji sadrže cistin (dlake, perje itd.) oboje se crnosmeđe.

6.4. *Pregled hrane za životinje koja može sadržavati riblje brašno*

Pod mikrobiološkim sastavljenim mikroskopom pregleda se najmanje jedan mikroskopski preparat iz sitno prosijane frakcije i sitne frakcije taloga (vidi točke 6.1. i 6.2. ovoga Priloga).

Kada se na oznaci navodi da sastojci sadrže riblje brašno ili kada kod početnog pregleda postoji sumnja ili se detektira riblje

brašno, iz izvornog uzorka treba pregledati najmanje dva dodatna mikroskopska preparata iz sitno prosijane frakcije i ukupne frakcije taloga.

7. Izračun i procjena

Nadležno tijelo osigurava da se postupci opisani u ovoj točki koriste u provedbi službenih analiza za procjenu razine (a ne samo prisutnosti) sastojaka životinjskog podrijetla.

Izračun se može izvršiti isključivo ako sastojci životinjskog podrijetla sadrže dijelove kosti.

Dijelovi kosti toplokrvnih kopnenih životinjskih vrsta (tj. sisavaca i ptica) mogu se u mikroskopskim preparatima razlučiti od različitih vrsta ribljih kosti na temelju tipičnih koštanih lakuna.

Udjel sastojaka životinjskog podrijetla u uzorkovanom se materijalu procjenjuje s obzirom na:

- procijenjeni udio (% mase) koštanih dijelova u koncentriranom talogu, i
- udio (% mase) kosti u sastojcima životinjskog podrijetla.

Procjena se mora temeljiti na najmanje tri mikroskopska preparata (ukoliko je moguće) i najmanje pet polja po preparatu. Koncentrirani talog u krmnim smjesama u pravilu ne sadrži samo dijelove kosti kopnenih životinja i riba, nego i druge dijelove visoke specifične mase, npr. minerale, pijesak, odrvenjele dijelove biljaka i slično.

7.1. *Procijenjena vrijednost postotnog udjela koštanih dijelova*

% dijelova kosti kopnenih životinja = $(S \times c)/W$

% dijelova ribljih kosti i ljusaka = $(S \times d)/W$

(S = masa taloga (mg), c = korekcijski faktor (%) za procijenjeni udio kosti kopnenih životinja u talogu, d = korekcijski faktor (%) za procijenjeni udio ribljih kosti i dijelova ljusaka u talogu, W = masa materijala uzorka za sedimentaciju (mg)).

7.2. *Procijenjena vrijednost sastojaka životinjskog podrijetla*

Udio kosti u proizvodima životinjskog podrijetla može se znatno razlikovati. (Udio kosti u koštanom brašnu reda je veličine 50 – 60%, u mesnom brašnu reda veličine 20 – 30%; u ribljem se brašnu udio kosti i ljusaka razlikuje s obzirom na kategoriju i podrijetlo ribljeg brašna, obično je reda veličine 10 – 20%).

Ako je poznata vrsta brašna životinjskog podrijetla prisutnog u uzorku, moguće je procijeniti udio:

Procijenjeni udio sastojaka proizvoda od kopnenih životinja (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Procijenjeni udio sastojaka ribljih proizvoda (%) = $(S \times d)/(W$

$\times f) \times 100$

(S = masa taloga (mg), c = korekcijski faktor (%) za procijenjeni udio koštanih sastojaka kopnenih životinja u talogu, d = korek

27. PROSINCA 2010. BROJ 146 – STRANICA 57

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

2. Načelo

Metil benzokvat se iz uzorka ekstrahira otopinom metanol metansulfonske kiseline. Ekstrakt se pročisti diklormetanom ionskoizmjenjivačkom kromatografi jom i zatim ponovo diklormetanom.

Udio metil benzokvata određuje se visoko djelatnom tekućinskom kromatografi jom (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Diklormetan

3.2. Metanol, za HPLC

3.3. HPLC mobilna faza

Smjesa metanola (točka 3.2. ovoga Dijela) i vode (za HPLC)

75 + 25 (v + v)

Filtrira se kroz fi ltar 0,22 μ m (točka 4.5. ovoga Dijela) i otopina otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

3.4. Otopina metansulfonske kiseline, c = 2%

Metanolom se razrijedi 20,0 mL metansulfonske kiseline do 1000 mL (točka 3.2. ovoga Dijela).

3.5. Otopina kloridne kiseline, c = 10%

Vodom se razrijedi 100 mL kloridne kiseline (ρ_{20} 1,18 g/mL) do 1000 mL.

3.6. Kationska izmjenjivačka smola Amberlite CG-120 (Na), 100 do 200 mesh

Smola se prije uporabe obradi. Suspendira se 100 g smole u 500 mL otopine kloridne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela) i uz stalno miješanje zagrijava na grijaćoj ploči do ključanja. Ostavi se ohladiti i kiselina se odlije. Filtrira se kroz fi ltar papir pod vakuumom. Smola se dvaput ispere s 500 mL vode, zatim s 250 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela). Ispere se još jednom s 250 mL metanola i osuši propuhivanjem zraka kroz fi ltriranu pogaču. Suha se smola pohrani u zatvorenoj boci.

3.7. Standardna tvar: čisti metil benzokvat (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolon)

3.7.1. Standardna osnovna otopina metil benzokvata, 500 μ g/

mL

Odvagne se 50 mg standardne tvari (točka 3.7. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg, otopi u otopini metansulfonske kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela) u graduiranoj tikvici volumena 100 mL, dopuni do oznake i promiješa.

3.7.2. Intermedijarna standardna otopina metil benzokvata, 50 µg/mL

Prenese se 5,0 mL osnovne standardne otopine metil benzokvata (točka 3.7.1. ovoga Dijela) u graduiranu tikvicu volumena 50 mL, dopuni do oznake metanolom (točka 3.2. ovoga Dijela) i promiješa.

3.7.3. Kalibracijske otopine

U seriju graduiranih tikvica volumena 25 mL prenese se 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0 mL intermedijarne standardne otopine metil benzokvata (točka 3.7.2. ovoga Dijela). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.3. ovoga Dijela) i promiješa. Koncentracija metil benzokvata u tim otopinama iznosi 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10,0 µg/mL. Te se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

4. Oprema

4.1. Laboratorijska tresilica

4.2. Tankoslojni rotacioni otparivač

4.3. Staklena kolona (250 mm × 15 mm) s pipcem i spremnikom kapaciteta približno 200 mL

– Preostala nečistoća koristi se za sedimentaciju sukladno točki 6.2. ovoga Priloga.

PRILOG VII.

METODA IZRAČUNA ENERGETSKE VRIJEDNOSTI KRMNIH SMJESA ZA PERAD

1. Metoda izračuna i izražavanja energetske vrijednosti

Energetska vrijednost krmnih smjesa za perad mora se izračunati na temelju postotka nekih analitičkih sastojaka hrane za životinje, prema formuli navedenoj u tekstu što slijedi. Ova se vrijednost iskazuje u megadžulima (MJ) metaboličke energije (ME), s korekcijama za dušik, na kilogram krmne smjese:

$$\text{MJ/kg ME} = 0,1551 \times \% \text{ sirovih bjelančevina} + 0,3431 \times \% \text{ sirovih masti} + 0,1669 \times \% \text{ škroba} + 0,1301 \times \% \text{ ukupnog šećera}$$

(iskazanog kao saharoza).

2. Odstupanja primjenjiva za označene vrijednosti

Ukoliko službena inspekcija otkrije razliku između rezultata pregleda i označene energetske vrijednosti (povećana ili smanjena energetska vrijednost hrane za životinje), dopušteno je najmanje

odstupanje od 0,4 MJ/kg ME.

3. Izražavanje rezultata

Nakon primjene gore navedene formule dobiveni rezultat treba biti izražen na jedno decimalno mjesto.

4. Metode uzorkovanja i analitičke metode

Uzorkovanje krmnih smjesa i određivanje udjela analitičkih sastojaka navedenih u metodi izračuna treba se izvršiti sukladno metodama propisanim u skladu sa zakonodavstvom Europske unije (u daljnjem tekstu: EU) i odnosnim analitičkim metodama za službene kontrole hrane za životinje.

Primjenjuje se sljedeće:

- za određivanje udjela sirove masti: postupak B metode za određivanje sirovih ulja i masti iz Dijela H Priloga III. ovoga Pravilnika,
- za određivanje udjela škroba: polarimetrijska metoda iz Dijela L Priloga III. ovoga Pravilnika.

PRILOG VIII.

ANALITIČKE METODE ZA KONTROLU

PRISUTNOSTI NEDOPUŠTENIH DODATAKA

HRANI ZA ŽIVOTINJE

Važne napomene:

Za detekciju prisutnosti nedopuštenih dodataka hrani za životinje mogu se primjenjivati osjetljivije analitičke metode od analitičkih metoda navedenih u ovom Prilogu.

Za potvrdu se primjenjuju analitičke metode iz ovoga priloga.

Dio A.

ODREĐIVANJE METIL BENZOKVATA

7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolon

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine metil benzokvata u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

minutu. Eluat se odbaci. Metil benzokvat se iz kolone eluira sa 150 mL otopine metansulfonske kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela), a eluat iz kolone prikupi u konusnu tikvicu volumena 250 mL.

5.5. *Razdvajanje tekuće-tekuće*

Dobiveni eluat (točka 5.4.2. ovoga Dijela) prenese se u lijevak za odjeljivanje volumena 1 L. Konusna tikvica se ispere s 5 – 10 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), a isprana tekućina pomiješa sa udjelom u lijevku za razdvajanje. Doda se 300 mL otopine kloridne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela) i 130 mL diklormetana (točka 3.1. ovoga Dijela). Mućka se 1 minutu i ostavi da se faze razdvoje. Donji (diklormetanski) sloj se odlije u tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL. Ekstrakcija vodene faze se ponovi dvaput sa dodatnih 70 mL diklormetana, a oba ekstrakta pomiješaju s prvim u tikvici s okruglim dnom.

Ekstrakt diklormetana se otpari do suhog u rotacionom otparivaču (točka 4.2. ovoga Dijela) pod sniženim tlakom na 40 °C. Ostatak u tikvici se otopi u približno 5 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), a otopina prenese kvantitativno u graduiranu tikvicu volumena 10 mL. Tikvica s okruglim dnom se dvaput ispere s dodatnih 1 – 2 mL metanola, a isprane tekućine prenesu u graduiranu tikvicu. Dopuni se metanolom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (točka 4.6. ovoga Dijela). Ta se otopina pohrani za HPLC određivanje (točka 5.6. ovoga Dijela).

5.6 *HPLC određivanje*

5.6.1. *Parametri*

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

- kolona za tekućinsku kromatografiju (točka 4.4.1. ovoga Dijela);
- HPLC mobilna faza: smjesa metanola i vode (točka 3.3. ovoga Dijela);
- brzina protoka: 1 – 1,5 mL/min;
- valna duljina detekcije: 265 nm;
- volumen za injektiranje: 20–50 µL.

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine koncentracije 4,0 µg/mL (točka 3.7.3. ovoga Dijela) sve dok se ne dobiju konstantne visine ili površine pika i konstantna vremena retencije.

5.6.2. *Kalibracijska krivulja*

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.7.3. ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/mL.

5.6.3. Otopina uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.5. ovoga Dijela), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pika metil benzokvata.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u $\mu\text{g/mL}$ određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika metil benzokvata iz kalibracijske krivulje (točka 5.6.2. ovoga Dijela).

Udio metil benzokvata (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: $300\text{ mm} \times 4\text{ mm}$, C_{18} , s veličinom čestica punjenja $10\text{ }\mu\text{m}$ ili ekvivalentna

4.5. Membranski fi ltri, $0,22\text{ }\mu\text{m}$

4.6. Membranski fi ltri, $0,45\text{ }\mu\text{m}$

5. Postupak

5.1. Općenito

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje provjerava se da nisu prisutni ni metil benzokvat niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine metil benzokvata podjednakoj količini u uzorku. Za obogaćenje na razinu od 15 mg/kg u 20 g slijepe probe hrane za životinje doda se $600\text{ }\mu\text{L}$ osnovne standardne otopine (točka 3.7.1. ovoga Dijela), promiješa i pričekava 10 min prije početka postupka ekstrakcije (točka 5.2. ovoga Dijela).

Napomena: Kod ove metode slijepa proba hrane za životinje treba biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smije utvrditi metil benzokvat.

5.2. Ekstrakcija

Odvagne se približno 20 g pripravljenog uzorka s preciznošću od $0,01\text{ g}$ i prenese u konusnu tikvicu volumena 250 mL . Doda se $100,0\text{ mL}$ otopine metansulfonske kiseline (točka 3.4. ovoga Dijela) i mehanički protresa (točka 4.1. ovoga Dijela) 30 min . Otopina se fi ltrira kroz fi ltar papir, a fi ltrat se spremi za postupak razdvajanja tekuće-tekuće (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. Razdvajanje tekuće-tekuće

U lijevak za odjeljivanje volumena 500 mL u kojem se nalazi 100 mL otopine kloridne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela) prenese se $25,0\text{ mL}$ fi ltrata dobivenog u postupku iz točke 5.2. U lijevak se

doda 100 mL diklormetana (točka 3.1. ovoga Dijela) i mučka jednu minutu. Pričeka se da se slojevi razdvoje, donji (diklormetanski) sloj se odlije u tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL. Dvaput se ponovi ekstrakcija vodene faze s 40 mL diklormetana, a dobiveni se ekstrakti spoje s prvim ekstraktom u tikvici s okruglim dnom. Ekstrakt diklormetana otpari se do suhog u rotacionom otparivaču (točka 4.2. ovoga Dijela) pri sniženom tlaku na 40 °C. Ostatak se otopi u 20 – 25 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), tikvica se začepi i sav ekstrakt spremi za ionsko-izmjenjivačku kromatografiju (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.4 Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

5.4.1. Priprema kationske izmjenjivačke kolone

U donji dio staklene kolone postavi se mali čep od staklene vune (točka 4.3. ovoga Dijela). Pripremi se suspenzija s 5,0 g obrađene kationske izmjenjivačke smole (točka 3.6. ovoga Dijela) i 50 mL kloridne kiseline (točka 3.5. ovoga Dijela), ulije u staklenu kolonu i pričeka da se umiri. Ukloni se višak kiseline do visine neposredno iznad površine smole, zatim se kolona ispiri vodom do neutralne reakcije eluata na lakmus papir. U kolonu se prenese 50 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela) i ostavi da istekne do površine smole.

5.4.2. Kolonska kromatografija

Dobiveni se ekstrakt (točka 5.3. ovoga Dijela) pipetom pažljivo prenese u kolonu. Tikvica s okruglim dnom se dvaput ispere s 5 – 10 mL metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), a isprane tekućine prenesu u kolonu. Ekstrakt se ulije do površine smole i kolona ispere s 50 mL metanola, pri čemu brzina protoka ne smije prijeći 5 mL na

ND = nije detektirano;

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti u %;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti u %.

Dio B.

ODREĐIVANJE OLAKVINDOKSA

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N1,N4-

dioksid

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine olakvindoksa u hrani za životinje. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira smjesom vode i metanola. Udio olakvindoksa određuje se visokodjelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Metanol, za HPLC

3.3. Voda, za HPLC

3.4. HPLC mobilna faza

Smjesa vode (točka 3.3. ovoga Dijela) i metanola (točka 3.2. ovoga Dijela), 900 + 100 (V + V)

3.5. Standardna tvar: čisti olakvindoks 2-[N-2'-(hidroksietil) karbamoil]-3-metilkinoksalin-N₁,N₄-dioksid, E 851

3.5.1. Osnovna standardna otopina olakvindoksa, 250 µg/mL

Odvagne se 50 mg olakvindoksa (točka 3.5. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građiranu tikvicu volumena 200 mL, zatim se doda približno 190 mL vode. Tikvica se zatim drži 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1. ovoga Dijela). Nakon obrade ultrazvukom, otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani u hladnjaku. Ta se otopina mora pripremiti svjež svakog mjesec.

3.5.2. Intermedijerna standardna otopina olakvindoksa, 25 µg/mL

Prenese se 10,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.5.1. ovoga Dijela) u građiranu tikvicu volumena 100 mL, dopuni mobilnom fazom (točka 3.4. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom i pohrani u hladnjaku. Ova se otopina mora pripremiti svjež svakog dan.

3.5.3. Kalibracijske otopine

U seriju građiranih tikvica volumena 50 mL prenese se 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 i 20,0 mL intermedijerne standardne otopine (točka 3.5.2. ovoga Dijela). Dopuni se mobilnom fazom (točka 3.4. ovoga Dijela) do oznake i promiješa. Tikvice se omota aluminijskom folijom. Ove otopine odgovaraju količini od 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 i 10,0 µg olakvindoksa na mL. Ove se otopine moraju pripremiti svjež svakog dan.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučna kupelj

4.2. Mehanička tresilica

4.3. Oprema za HPLC s detektorom ultraljubičastog svjetla s mogućnošću promjene valne duljine ili detektorom s nizom dioda pri čemu je:

c = koncentracija metil benzokvata u otopini uzorka u $\mu\text{g/mL}$;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. *Identifikacija*

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojima se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.7.3. ovoga Dijela) koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Ekstrakt uzorka se obogati dodavanjem odgovarajuće količine intermedijarne standardne otopine (točka 3.7.2. ovoga Dijela). Količina dodanog metil benzokvata mora biti slična procijenjenoj količini metil benzokvata u ekstraktu uzorka.

Može se povećati samo visina pika metil benzokvata uzimajući u obzir dodane količine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika na polovici njegove najviše visine mora biti približno unutar 10% vrijednosti prvotne širine.

7.1.2. *Detekcija s nizom dioda*

Rezultati se ocjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi približno unutar 2 nm;

(b) između 220 i 350 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorpcije. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorpcije standardnog analita;

(c) između 220 i 350 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorpcije. To je mjerilo ispunjeno kada su prisutne

jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke. Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći: 10% relativno u odnosu na najviši rezultat za udio metil benzokvata između 4 i 20 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak iskorištenje mora iznositi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedena je analiza 5 uzoraka u 10 laboratorija. Svaki se uzorak analizirao dvaput.

Slijepa

proba Brašno 1 Pelete 1 Brašno 2 Pelete 2

Srednja vrijednost

[mg/kg] sr [mg/kg]

ND

—

4,50

0,30

4,50 0,20 8,90 0,60 8,70

0,50

CV_i [%]

s_R [mg/kg]

CV_R [%]

Iskorištenje [%]

—

—

—

—

6,70

0,40

8,90

92,00

4,40

0,50

11,10

93,00

6,70

0,90 10,10

92,00

5,70
1,00
11,50
89,00

STRANICA 60 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

5.4.3. *Otopina uzorka*

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela), pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijsku otopinu, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pika olakvindoksa.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u $\mu\text{g/mL}$ određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika olakvindoksa u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.3.2. ovoga Dijela).

Udio olakvindoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

c = koncentracija olakvindoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela) u $\mu\text{g/mL}$;

m = masa testnog uzorka u g (točka 5.2. ovoga Dijela).

7. Validacija rezultata

7.1. *Identifikacija*

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela) i spektar kalibracijske otopine (točka 3.5.3. ovoga Dijela) koncentracije $5,0 \mu\text{g/mL}$.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Ekstrakt uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela) se obogati dodavanjem primjerene količine kalibracijske otopine (točka 3.5.3. ovoga Dijela). Količina dodanog olakvindoksa mora biti podjednaka utvrđenoj količini olakvindoksa u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika olakvindoksa uzimajući u obzir dodane razine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika olakvindoksa u ekstraktu neobogaćenog uzorka.

7.1.2. *Detekcija s nizom dioda*

Rezultati se ocjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm$ 2 nm;

(b) između 220 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;

(c) između 220 i 400 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

4.3.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili ekvivalentna

4.4. Membranski filtri, 0,45 µm

5. Postupak

Napomena: Olakvindoks je osjetljiv na svjetlo. Svi se postupci izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posuđu od smeđeg stakla.

5.1. Općenito

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje potvrđuje se da nisu prisutni ni olakvindoks niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine olakvindoksa podjednako količini u uzorku. Za obogaćenje na razinu od 50 mg/kg, prenese se 10,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.5.1. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 250 mL i otopina otpari do približno 0,5 mL. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2. ovoga Dijela).

Napomena: U provedbi ove metode slijepa proba hrane za

životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost olakvindoksa.

5.2. *Ekstrakcija*

Odvagne se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g.

Prenese se u konusnu tikvicu volumena 1000 mL, doda 100 mL metanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i tikvica 5 minuta drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.1. ovoga Dijela). Doda se 410 mL vode i ostavi daljnjih 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Tikvica se izvadi iz ultrazvučne kupelji, 30 minuta protresa na tresilici (točka 4.2. ovoga Dijela), zatim fi ltrira kroz nabrani fi ltar. Prenese se 10,0 mL fi ltrata u graduiranu tikvicu volumena 20 mL, dopuni vodom do oznake i promiješa. Alikvot se fi ltrira kroz membranski fi ltar (točka 4.4. ovoga Dijela) (vidi Napomenu pod točkom 9. ovoga Dijela). Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. *HPLC određivanje*

5.3.1. *Parametri*

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

Analitička kolona

(točka 4.3.1. ovoga Dijela)

Mobilna faza

(točka 3.4. ovoga Dijela): smjesa vode (točka 3.3. ovoga Dijela) i metanola (točka 3.2. ovoga Dijela),

900 + 100 (V + V)

Brzina protoka: 1,5 – 2 mL/min

Valna duljina detekcije: 380 nm

Volumen za injektiranje: 20 – 100 µL

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.5.3. ovoga Dijela) koncentracije 2,5 µg/mL sve dok se ne dobiju konstantne visine pika i konstantna vremena retencije.

5.3.2. *Kalibracijska krivulja*

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.5.3. ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/mL.

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

3.3. Voda, za HPLC

3.4. Otopina natrijevog dihidrogen fosfata, $c = 0,1 \text{ mol/L}$

U građuiranoj tikvici volumena 1000 mL otopi se u vodi (točka

3.3. ovoga Dijela) 13,80 g natrijevog dihidrogen fosfat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3. ovoga Dijela) do oznake i promiješa.

3.5. Otopina natrijevog perklorata, $c = 1,6 \text{ mol/L}$

U građuiranoj tikvici volumena 1000 mL otopi se u vodi (točka

3.3. ovoga Dijela) 224,74 g natrijevog perklorat monohidrata, dopuni vodom (točka 3.3. ovoga Dijela) do oznake i promiješa.

3.6. HPLC mobilna faza (vidi Napomenu pod točkom 9.1. ovoga Dijela).

Smjesa acetonitrila (točka 3.2. ovoga Dijela), otopine natrijevog dihidrogen fosfata (točka 3.4. ovoga Dijela) i otopine natrijevog perklorata (točka 3.5. ovoga Dijela), $450 + 450 + 100 (v + v + v)$. Prije uporabe fi ltrira se kroz membranski fi ltar $0,22 \mu\text{m}$ (točka 4.3. ovoga Dijela), a otopina se otplini (npr. najmanje 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4. ovoga Dijela)).

3.7. Standardna tvar: čisti amprolium, I-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinium klorid hidroklorid, E 750 (vidi točku 9.2. ovoga Dijela)

3.7.1. Osnovna standardna otopina amproliuma, $500 \mu\text{g/mL}$

Odvagne se 50 mg amproliuma (točka 3.7. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u građuiranu tikvicu volumena 100 mL, otopi u 80 mL metanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i tikvicu 10 minuta drži u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.4. ovoga Dijela). Nakon obrade ultrazvukom otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Na temperaturi $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.7.2. Intermedijarna standardna otopina amproliuma, $50 \mu\text{g/mL}$

Pipetom se prenese 5,0 mL osnovne standardne otopine (točka

3.7.1. ovoga Dijela) u građuiranu tikvicu volumena 50 mL, dopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom (točka 3.8. ovoga Dijela) i promiješa.

Na temperaturi $\leq 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ otopina je stabilna 1 mjesec.

3.7.3. Kalibracijske otopine

U seriju građuiranih tikvica volumena 50 mL prenese se 0,5; 1,0 i 2,0 mL intermedijarne standardne otopine (točka 3.7.2. ovoga Dijela). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (točka 3.6. ovoga Dijela) i promiješa. Ove otopine odgovaraju koncentraciji od 0,5; 1,0 i 2,0 µg amproliuma na mL. Ove se otopine moraju pripremiti svježe prije uporabe.

3.8. Ekstrakcijsko otapalo

Smjesa metanola (točka 3.1. ovoga Dijela) i vode 2 + 1 (v + v)

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje prikladnim za injektiranje volumena od 100 µL

4.1.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju, 125 mm × 4 mm s izmjenom kationa, Nucleosil 10 SA veličina čestica punila 5 ili 10 µm ili ekvivalentno

4.1.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda

4.2. Membranski filter, materijal PTFE, 0,45 µm

4.3. Membranski filter, 0,22 µm

4.4. Ultrazvučna kupelj

4.5. Mehanička tresilica ili magnetska miješalica

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 15% relativno u odnosu na najviši rezultat za udio olakvindoksa između 10 i 200 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Za obogaćeni slijepi uzorak iskorištenje mora iznositi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje na razini EU u kojoj se u najviše 13 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za prasad, uključujući jednu slijepu probu. Rezultati su prikazani u donjoj tablici:

Uzorak 1 Uzorak 2 Uzorak 3 Uzorak 4

L 13 10 11 11

n 40 40 44 44

srednja vrijednost

[mg/kg]

— 14,6 48,0 95,4

s_r [mg/kg] — 0,82 2,05 6,36

s_R [mg/kg] — 1,62 4,28 8,42

CV_r [%] — 5,6 4,3 6,7

CV_R [%] — 11,1 8,9 8,8

Nominalni udio

[mg/kg] — 15 50 100

Iskorištenje % — 97,3 96,0 95,4

L = broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti;

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti.

9. Napomena

Iako metoda nije vrednovana za hranu za životinje koja sadrži više od 100 mg/kg olakvindoksa, mogu se dobiti zadovoljavajući rezultati uporabom manje mase uzorka i/ili razrjeđivanjem ekstrakta (točka 5.2. ovoga Dijela) tako da se dobije koncentracija u području kalibracijske krivulje (točka 5.3.2. ovoga Dijela).

Dio C.

ODREĐIVANJE AMPROLIUMA

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinium klorid hidroklorid

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine amproliuma u hrani za životinje i premiksima. Granica detekcije je 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se ekstrahira smjesom metanola i vode. Nakon razrjeđivanja mobilnom fazom i membranske filtracije, udio amproliuma određuje se visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s izmjenom kationa uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol

3.2. Acetonitril, za HPLC

fosfata (točka 3.4. ovoga Dijela) i
otopine natrijevog perklorata (točka
3.5. ovoga Dijela),

$450 + 450 + 100 (v + v + v)$

Brzina protoka: 0,7 – 1 mL/min

Valna duljina detekcije: 264 nm

Volumen za injektiranje: 100 μ L

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim
injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.7.3. ovoga Dijela) koncentracije
1,0 μ g/mL sve dok se ne dobiju konstantne visine pika i
konstantna vremena retencije.

5.3.2. *Kalibracijska krivulja*

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.7.3.
ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina
(površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na
ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pika kalibracijskih
otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u μ g/mL.

5.3.3. *Otopina uzorka*

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela),
pri čemu se koriste jednaki volumeni kao za kalibracijske otopine, zatim
se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova amproliuma.

6. Izračun rezultata

Koncentracija otopine uzorka u μ g/mL određuje se iz srednjih
vrijednosti visina (površina) pikova amproliuma u otopini uzorka iz
kalibracijske krivulje (točka 5.3.2. ovoga Dijela).

Udio amproliuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom
formulom:

pri čemu je:

V = volumen ekstrakcijskog otapala (točka 3.8. ovoga Dijela) u
mL sukladno točki 5.2. ovoga Dijela (tj. 200 mL);

c = koncentracija amproliuma u ekstraktu uzorka (točka 5.2.
ovoga Dijela) u μ g/mL;

f = faktor razrjeđenja sukladno točki 5.2. ovoga Dijela;

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. *Identifikacija*

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili
detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta
uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela) i spektar kalibracijske otopine (točka
3.7.3. ovoga Dijela) koncentracije 2,0 μ g/mL.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Ekstrakt uzorka (točka 5.2. ovoga Dijela) se obogati dodavanjem prikladne količine kalibracijske otopine (točka 3.7.3. ovoga Dijela). Količina dodanog amproliuma mora biti podjednaka procijenjenoj količini amproliuma određenoj u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika amproliuma uzimajući u obzir dodane razine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika amproliuma u neobogaćenom ekstraktu uzorka.

7.1.2. *Detektor s nizom dioda*

Rezultati se ocjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

(a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma,

5. Postupak

5.1. *Općenito*

5.1.1. *Slijepa proba hrane za životinje*

Kod primjene testa iskorištenja (točka 5.1.2. ovoga Dijela) analizom slijepa probe hrane za životinje provjeri se da nisu prisutni ni amprolium niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje treba biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju utvrditi niti amprolium niti interferentne tvari.

5.1.2. *Test iskorištenja*

Test iskorištenja provodi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogati dodavanjem količine amproliuma podjednakoj količini u uzorku. Za obogaćenje na razinu od 100 mg/kg, prenese se 10,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.7.1. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 250 mL i otopina otpari do približno 0,5 mL. Doda se 50 g slijepa probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta te ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2. ovoga Dijela). Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku (vidi točku 5.1.1. ovoga Dijela), test iskorištenja može se umjesto toga provesti metodom dodavanja standarda. U tom se slučaju uzorak za analizu obogati sa količinom amproliuma podjednakom onom u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. *Premiksi (udio amproliuma < 1%) i hrana za životinje*

Odvagne se 5 – 40 g uzorka, ovisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,01 g, prenese u konusnu tikvicu volumena 500 mL

i doda 200 mL ekstrakcijskog otapala (točka 3.8. ovoga Dijela). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4. ovoga Dijela) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom miješalicom (točka 4.5. ovoga Dijela). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6. ovoga Dijela) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/mL i promiješa (vidi Napomenu pod točkom 9.3. ovoga Dijela). Filtira se 5 – 10 mL tako razrijeđene otopine kroz membranski fi ltar (točka 4.2. ovoga Dijela). Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.2.2. Premiksi (*udio amproliuma* ≥ 1%)

Odvagne se 1 – 4 g uzorka, ovisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,001 g, prenese u konusnu tikvicu volumena 500 mL i doda 200 mL ekstrakcijskog otapala (točka 3.8. ovoga Dijela). Tikvica se stavi u ultrazvučnu kupelj (točka 4.4. ovoga Dijela) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučne kupelji i 1 sat protresa u tresilici ili miješa magnetskom miješalicom (točka 4.5. ovoga Dijela). Alikvot ekstrakta se razrijedi mobilnom fazom (točka 3.6. ovoga Dijela) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/mL i promiješa. Filtira se 5 – 10 mL tako razrijeđene otopine kroz membranski fi ltar (točka 4.2. ovoga Dijela). Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.3. HPLC određivanje

5.3.1. Parametri:

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.1.1. ovoga Dijela): 125 mm × 4 mm, s izmjenom kationa

Nucleosil 10 SA, veličina čestica

punila 5 ili 10 µm ili ekvivalentno

Mobilna faza

(točka 3.6. ovoga Dijela): Smjesa acetonitrila (točka 3.2. ovoga Dijela), otopine natrijevog dihidrogen

amprolium i tiamin se moraju razdvojiti. Ako se amprolium i tiamin ne razdvajaju na koloni (točka 4.1.1. ovoga Dijela) korištenoj u toj metodi, metanolom se zamijeni do 50% acetonitrila u mobilnoj fazi

(točka 3.6. ovoga Dijela).

9.2. Prema Britanskoj farmakopeji, najviše točke spektra otopine amproliuma ($c = 0,02 \text{ mol/L}$) u kloridnoj kiselini ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) nalaze se na 246 nm i 262 nm. Apsorbancija iznosi 0,84 na 246 nm i 0,80 na 262 nm.

9.3. Ekstrakt se uvijek mora razrijediti mobilnom fazom, u suprotnom bi se retencijsko vrijeme pika amproliuma moglo znatno pomaknuti zbog promjena ionske sile.

Dio D.

ODREĐIVANJE KARBADOKSA

Metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N1,N4-dioksid

1. Svrha i opseg primjene

Ovom se metodom omogućuje određivanje razine karbadoksa u hrani za životinje, premiksima i pripravcima. Granica detekcije iznosi 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Načelo

Uzorak se uravnoteži vodom i ekstrahira metanol-acetonitrilom.

Kod hrane za životinje pročisti se alikvotni dio filtriranog ekstrakta na koloni iz aluminijevog oksida. Kod premiksa i pripravaka alikvotni se dio filtriranog ekstrakta razrijedi do primjerene koncentracije vodom, metanolom i acetonitrilom. Udio karbadoksa određuje se visoko djelatnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) s reverznom fazom uz uporabu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, za HPLC.

3.3. Octena kiselina, $w = 100\%$.

3.4. Aluminijev oksid: neutralni, stupnja aktivnosti I.

3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v).

Pomiješa se 500 mL metanola (točka 3.1. ovoga Dijela) s 500 mL acetonitrila (točka 3.2. ovoga Dijela).

3.6. Octena kiselina, $\sigma = 10\%$.

Vodom se razrijedi 10 mL octene kiseline (točka 3.3. ovoga Dijela) do 100 mL.

3.7. Natrijev acetat

3.8. Voda, za HPLC.

3.9. Otopina acetatnog pufera, $c = 0,01 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 6,0$.

Otopi se 0,82 g natrijevog acetata (točka 3.7. ovoga Dijela) u 700 mL vode (točka 3.8. ovoga Dijela), vrijednost pH se octenom kiselinom (točka 3.6. ovoga Dijela) podesi na 6,0. Prenese se u graduiranu

tikvicu volumena 1000 mL, dopuni vodom (točka 3.8. ovoga Dijela) do oznake i promiješa.

3.10. HPLC mobilna faza

Pomiješa se 825 mL otopine acetatnog pufera (točka 3.9. ovoga Dijela) sa 175 mL acetonitrila (točka 3.2. ovoga Dijela).

Filtrira se kroz fi ltar 0,22 μ m (točka 4.5. ovoga Dijela), a otopina otplini (npr. 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji).

3.11. Standardna tvar

Čisti karbadoks: metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N₁,N₄-dioksid, E 850

moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar $\pm$ 2 nm;

(b) između 210 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki pika kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije.

Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;

(c) između 210 i 320 nm, spektri krivulje rasta, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke pika.

Ako nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio amproliuma od 25 – 500 mg/kg,
- 75 mg/kg za udio amproliuma od 500 – 1000 mg/kg,
- 7,5% relativno u odnosu na višu vrijednost za udio amproliuma veći od 1000 mg/kg.

7.3. Iskorištenje

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje u kojem se analiziralo

tri uzorka hrane za perad (uzorci 1 – 3), jedan uzorak mineralne hrane za životinje (uzorak 4) i jedan uzorak premiksa (uzorak 5). Rezultati su navedeni u donjoj tablici:

Uzorak 1

(slijepa

proba

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

sr [mg/kg] — 2,26 3,57 178 550

CVr [%] — 4,95 1,90 3,46 2,20

sR [mg/kg] — 2,95 11,8 266 760

CVR [%] — 6,47 6,27 5,19 3,00

Nominalni udio [mg/kg] — 50 200 5000 25000

L= broj laboratorija;

n = broj pojedinačnih vrijednosti;

sr = standardna devijacija ponovljivosti;

CVr = koefi cijent varijacije ponovljivosti;

sR = standardna devijacija obnovljivosti;

CVR = koefi cijent varijacije obnovljivosti.

9. Napomene

9.1. Ako uzorak sadrži tiamin, pik tiamina u kromatogramu pojavljuje se malo prije pika amproliuma. Sukladno ovoj metodi,

STRANICA 64 – BROJ 146 PONEDJELJAK, 27. PROSINCA 2010.

NARODNE

NOVINE

SLUŽBENI LIST REPUBLIKE HR VA TSKE

treba biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju pronaći karbadoks niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorištenja

Test iskorištenja provodi se analizom slijepe probe hrane za životinje (točka 5.1.1. ovoga Dijela) koja se obogati dodavanjem količine karbadoksa podjednako količini u uzorku. Za obogaćivanje na razinu od 50 mg/kg, prenese se 5,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.11.1. ovoga Dijela) u konusnu tikvicu volumena 200 mL.

Otopina se otpari do približno 0,5 mL u struji dušika. Doda se 10 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa i ostavi 10 minuta prije prelaska na postupak ekstrakcije (točka 5.2. ovoga Dijela).

Ako nije dostupna slijepa probe hrane za životinje slična uzorku (vidi točku 5.1.1. ovoga Dijela), test iskorištenja može se umjesto toga provesti metodom dodavanja standarda. U ovom se slučaju uzorak obogati količinom karbadoksa podjednakoj količini u uzorku. Ovaj se uzorak analizira zajedno sa neobogaćenim uzorkom, a iskorištenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. *Ekstrakcija*

5.2.1. *Hrana za životinje*

Odvagne se 10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu volumena 200 mL. Doda se 15,0 mL vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 mL metanolacetonitrila (točka 3.5. ovoga Dijela), začepi i mučka 30 minuta u tresilici ili miješa magnetnom miješalicom (točka 4.1. ovoga Dijela). Otopina se fi ltrira kroz fi ltar papir od staklenih vlakana (točka 4.2. ovoga Dijela). Ova se otopina pohrani do faze pročišćavanja (točka 5.3. ovoga Dijela).

5.2.2. *Premiksi (0,1 – 2,0%)*

Odvagne se 1 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu volumena 200 mL. Doda se 15,0 mL vode, promiješa i ostavi stajati 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 mL metanol-acetonitrila (točka 3.5 ovoga Dijela.), začepi i mučka 30 minuta na tresilici ili miješa magnetnom miješalicom (točka 4.1. ovoga Dijela). Otopina se fi ltrira kroz fi ltar papir od staklenih vlakana (točka 4.2. ovoga Dijela).

Alikvot fi ltrata se pipetom prenese u kalibriranu tikvicu volumena 50 mL. Doda se 15,0 mL vode, dopuni do oznake metanolacetonitriлом (točka 3.5. ovoga Dijela) i promiješa. Koncentracija karbadoksa u konačnoj otopini iznosi približno 10 µg/mL. Alikvot se fi ltrira kroz fi ltar 0,45 µm (točka 4.6. ovoga Dijela). Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.2.3. *Pripravci (> 2%)*

Odvagne se 0,2 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu volumena 250 mL. Doda se 45,0 mL vode, promiješa i ostavi stajati 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 105,0 mL metanol-acetonitrila (točka 3.5. ovoga Dijela), začepi i homogenizira. Uzorak se drži 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.7. ovoga Dijela), zatim 15 minuta protresa ili miješa (točka

4.1. ovoga Dijela). Otopina se fi ltrira kroz fi ltar papir od staklenih vlakana (točka 4.2. ovoga Dijela).

Alikvot se fi ltrira razrijedi se smjesom vode, metanola i acetonitrila (točka 3.12. ovoga Dijela) tako da konačna koncentracija karbadoksa iznosi 10 – 15 µg/mL (za 10%-tni preparat, faktor razrjeđenja je 10). Alikvot se fi ltrira kroz fi ltar 0,45 µm (točka 4.6. ovoga Dijela). Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.3. *Pročišćavanje*

5.3.1. *Priprema kolone aluminijevog oksida*

Odvagne se 4 g aluminijevog oksida (točka 3.4. ovoga Dijela) i prenese na staklenu kolonu (točka 4.3. ovoga Dijela).

3.11.1. Osnovna standardna otopina karbadoksa, 100 µg/mL

(vidi Postupak pod točkom 5. ovoga Dijela):

Odvagne se 25 mg standardne tvari karbadoksa (točka 3.11. ovoga Dijela) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u graduiranu tikvicu volumena 250 mL. Otopi se u metanol-acetonitrilu (točka 3.5. ovoga Dijela) obradom u ultrazvučnoj kupelji (točka 4.7. ovoga Dijela). Nakon obrade ultrazvukom, otopina se zagrije do sobne temperature, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (točka 3.5. ovoga Dijela) i promiješa. Tikvica se omota aluminijskom folijom ili se koristi tikvica od smeđeg stakla i pohrani u hladnjaku. Na temperaturi ≤ 4°C otopina je stabilna 1 mjesec.

3.11.2. Kalibracijske otopine

U seriju kalibriranih tikvica volumena 100 mL prenese se 2,0; 5,0; 10,0 i 20,0 mL osnovne standardne otopine (točka 3.11.1. ovoga Dijela). Doda se 30 mL vode, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (točka 3.5. ovoga Dijela) i promiješa. Tikvice se omotaju aluminijskom folijom. Ove otopine odgovaraju koncentracijama karbadoksa od 2,0; 5,0; 10,0 i 20,0 µg/mL.

Kalibracijske otopine treba pripremiti svježe prije uporabe.

Napomena: Za određivanje karbadoksa u hrani za životinje koja sadrži manje od 10 mg/kg karbadoksa, moraju se pripremiti kalibracijske otopine koncentracije manje od 2,0 µg/mL.

3.12. Smjesa voda-[metanol-acetonitril] (točka 3.5. ovoga Dijela), 300 + 700 (v + v)

Pomiješa se 300 mL vode sa 700 mL smjese metanola i acetonitrila (točka 3.5. ovoga Dijela).

4. Oprema

4.1. Laboratorijska tresilica ili magnetska miješalica

4.2. Filtar papir iz staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentan)

4.3. Staklena kolona (duljine 300 do 400 mm, interni promjer približno 10 mm) sa sinteriranim staklenim fi ltrom i ispusnim pipcem

Napomena: Može se koristiti i staklena kolona s pipcem ili staklena kolona s konusnim završetkom; u tom se slučaju u donji kraj umetne mali jastučić od staklene vune i staklenim štapićem potisne na dno.

4.4. Oprema za HPLC sa sustavom za injektiranje primjerenim za injektiranje volumena od 20 μ L

4.4.1. Kolona za tekućinsku kromatografiju: 300 mm x 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 μ m ili ekvivalentna

4.4.2. UV detektor s mogućnošću promjene valne duljine ili detektor s nizom dioda u području 225 do 400 nm

4.5. Membranski fi ltar, 0,22 μ m

4.6. Membranski fi ltar, 0,45 μ m

4.7. Ultrazvučna kupelj

5. Postupak

Napomena: Karbadoks je osjetljiv na svjetlo. Svi se postupci izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posudu od smeđeg stakla ili u posudu omotanom aluminijskom folijom.

5.1. *Općenito*

5.1.1. *Slijepa proba hrane za životinje*

Kod primjene testa iskorištenja (točka 5.1.2. ovoga Dijela) analizom slijepe probe hrane za životinje provjeri se da nisu prisutni ni karbadoks niti interferentne tvari. Slijepa proba hrane za životinje

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.2.2. ili 5.2.3. ovoga Dijela) u μ g/mL;

V₂ = volumen ekstrakta u mL (tj. 50 za premikse; 150 za pripravke);

f = faktor razrjeđenja sukladno točki 5.2.2. ovoga Dijela (premiksi) ili točki 5.2.3. ovoga Dijela (pripravci);

m = masa testnog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. *Identifikacija*

Identifikacija analita može se potvrditi ko-kromatografijom ili

detektorom s nizom dioda kojim se uspoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracijske otopine (točka 3.11.2. ovoga Dijela) koncentracije 10,0 µg/mL.

7.1.1. *Ko-kromatografija*

Ekstrakt uzorka se obogati dodavanjem prikladne količine kalibracijske otopine (točka 3.11.2. ovoga Dijela). Količina dodanog karbadoksa mora biti podjednaka procijenjenoj količini karbadoksa u ekstraktu uzorka.

Dopušteno je povećanje samo visine pika karbadoksa uzimajući u obzir dodane razine i razrjeđenje ekstrakta. Širina pika, na polovici maksimalne visine, mora biti unutar približno 10% početne širine.

7.1.2. *Detektor s nizom dioda*

Rezultati se ocjenjuju sukladno sljedećim mjerilima:

- (a) valne duljine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj točki pika kromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sustava za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ova se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;
- (b) između 225 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj točki kromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije standardnog analita;
- (c) između 225 i 400 nm, spektri krivulje rasta pika, najviše točke pika i krivulje pada pika dobiveni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100% relativne apsorbancije. Ovo je mjerilo ispunjeno kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj točki ne prelazi 15% apsorbancije spektra najviše točke pika.

Ukoliko nije ispunjeno jedno od navedenih mjerila, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. *Ponovljivost*

Razlika između rezultata dva usporedna postupka određivanja, izvedena na istom uzorku, za udio od 10 mg/kg i više ne smije prijeći 15% relativno u odnosu na viši rezultat.

7.3. *Iskorištenje*

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorištenje iznosi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog određivanja

Provedeno je međulaboratorijsko određivanje u kojem se u 8 laboratorija analiziralo 6 uzoraka hrane za životinje, 4 uzorka premiksa i 3 uzorka pripravaka. Svaki je uzorak analiziran dvaput. (Detaljnije informacije o navedenom međulaboratorijskom određivanju)

5.3.2. *Pročišćavanje uzorka*

Propusti se 15 mL filtriranoga ekstrakta (točka 5.2.1. ovoga Dijela) kroz kolonu od aluminijskog oksida, a prva 2 mL eluata se odbace. Prikupi se sljedećih 5 mL, alikvot se filtrira kroz filter 0,45 μm (točka 4.6. ovoga Dijela).

Prelazi se na HPLC određivanje (točka 5.4. ovoga Dijela).

5.4. *HPLC određivanje*

5.4.1. *Parametri*

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

Kolona za tekućinsku kromatografiju

(točka 4.4.1. ovoga Dijela): 300 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 μm ili ekvivalentna

Mobilna faza

(točka 3.10. ovoga Dijela): Smjesa otopine acetatnog pufera (točka 3.9. ovoga Dijela) i acetonitrila

(točka 3.2. ovoga Dijela), 825 + 175

(v + v)

Brzina protoka: 1,5 – 2 mL/min

Valna duljina detekcije: 365 nm

Volumen za injektiranje: 20 μL

Provjeri se stabilnost kromatografskog sustava višekratnim injektiranjem kalibracijske otopine (točka 3.11.2. ovoga Dijela) koncentracije 5,0 $\mu\text{g/mL}$ sve dok se ne postignu konstantne visine (površine) pika i konstantna vremena retencije.

5.4.2. *Kalibracijska krivulja*

Više puta se injektira svaka kalibracijska otopina (točka 3.11.2. ovoga Dijela) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pika. Kalibracijska krivulja se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pika kalibracijskih otopina, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3. *Otopina uzorka*

Više puta se injektira ekstrakt uzorka [(točka 5.3.2. ovoga Dijela) za hranu za životinje, (točka 5.2.2. ovoga Dijela) za premikse i (točka 5.2.3. ovoga Dijela) za pripravke] i odredi srednja vrijednost

visina (površina) pika karbadoksa.

6. Izračun rezultata

Koncentracija karbadoksa u otopini uzorka u $\mu\text{g/mL}$ određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika karbadoksa u otopini uzorka iz kalibracijske krivulje (točka 5.4.2. ovoga Dijela).

6.1. *Hrana za životinje*

Udio karbadoksa w (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (točka 5.3.2.

ovoga Dijela) u $\mu\text{g/mL}$;

V_1 = volumen ekstrakta u mL (tj. 50);

m = masa testnog uzorka u gramima.

6.2. *Premiksi i pripravci*

Udio karbadoksa w (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

vanju mogu se pronaći u *Journal of AOAC*, svezak 71, 1988., 484, str. 484–490.) Rezultati (bez ekstremnih vrijednosti), prikazani su u donjim tablicama:

Tablica 1.

Rezultati međulaboratorijskog određivanja za hranu za životinje

Uzorak

1

Uzorak

2

Uzorak

3

Uzorak

4

Uzorak

5

Uzorak

6

L 8 8 8 8 8 8

n 15 14 15 15 15 15

Srednja vrijednost

(mg/kg) 50,0 47,6 48,2 49,7 46,9 49,7

s_r (mg/kg) 2,90 2,69 1,38 1,55 1,52 2,12

CV_r (%) 5,8 5,6 2,9 3,1 3,2 4,3

s_R (mg/kg) 3,92 4,13 2,23 2,58 2,26 2,44

CV_R (%) 7,8 8,7 4,6 5,2 4,8 4,9

Nominalni udio

(mg/kg) 50,0 50,0 50,0 50,0 50,0 50,0

Tablica 2.

Rezultati međulaboratorijskog određivanja za premikse i pripravke

Premiksi Pripravci

A B C D A B C

L 7 7 7 7 8 8 8

n 14 14 14 14 16 16 16

Srednja vrijednost

(g/kg) 8,89 9,29 9,21 8,76 94,6 98,1 104

s_r (g/kg) 0,37 0,28 0,28 0,44 4,1 5,1 7,7

CV_r (%) 4,2 3,0 3,0 5,0 4,3 5,2 7,4

s_R (g/kg) 0,37 0,28 0,40 0,55 5,4 6,4 7,7

CV_R (%) 4,2 3,0 4,3 6,3 5,7 6,5 7,4

Nominalni udio

(g/kg) 10,0 10,0 10,0 10,0 100 100 100

L= broj laboratorija;

n= broj pojedinačnih vrijednosti;

s_r = standardna devijacija ponovljivosti;

CV_r = koefi cijent varijacije ponovljivosti;

s_R = standardna devijacija obnovljivosti;

CV_R = koefi cijent varijacije obnovljivosti. ____