

1541.

Na osnovu člana 91 stav 4 Zakona o bezbjednosti hrane ("Službeni list CG", broj 57/15), Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja donijelo je

**PRAVILNIK
O METODAMA ZA UZIMANJE UZORAKA I LABORATORIJSKA ISPITIVANJA
HRANE ZA ŽIVOTINJE***

Predmet

Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se metode za uzimanje uzoraka i laboratorijska ispitivanja hrane za životinje.

Značenje izraza

Član 2

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sljedeća značenja:

- 1) **serija** je identifikovana količina hrane za životinje, koja posjeduje zajedničke osobine kao što su porijeklo, sorta, način pakovanja, pravno lice ili preduzetnik koje pakuje proizvode, proizvodna jedinica koja koristi jedinstveno postrojenje prilikom proizvodnje i skladištenja;
- 2) **uzorkovani dio** je serija ili identifikovani dio serije ili podserije;
- 3) **zapečaćeni uzorak** je uzorak koji je zapečaćen na način koji onemogućava pristupiti uzorku bez lomljenja ili uklanjanja pečata;
- 4) **pojedinačni uzorak** je količina koja se uzima kao uzorak sa jednog mjesta;
- 5) **zbirni uzorak** je skup pojedinačnih uzoraka uzetih iz istog uzorkovanog dijela;
- 6) **redukovani uzorak** je dio zbirnog uzorka dobijen postupkom reprezentativnog smanjivanja zbirnog uzorka;
- 7) **konačni uzorak** je dio redukovanog uzorka ili homogenizovanog zbirnog uzorka;
- 8) **laboratorijski uzorak** je uzorak namijenjen za laboratorijsko ispitivanje (konačan, smanjeni ili zbirni uzorak).

Uzimanje uzoraka hrane za životinje

Član 3

Uzimanje uzoraka za laboratorijska ispitivanja hrane za životinje vrši se u skladu sa metodama datim u Prilogu 1 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

**Priprema uzoraka hrane za životinje za laboratorijsko
ispitivanje**

Član 4

Uzorci hrane za životinje pripremaju se za laboratorijsko ispitivanje analitičkim metodama u skladu sa Prilogom 2 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Kontrola sastava sirovina za hranu za životinje

Član 5

Kontrola sastava sirovina za hranu za životinje vrši se u skladu sa metodama datim u Prilogu 3 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Kontrola nivoa dodataka hrani za životinje

Član 6

Kontrola nivoa dodataka hrani za životinje vrši se u skladu sa metodama datim u Prilogu 4 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Kontrolu nepoželjnih supstanci u hrani za životinje

Član 7

Kontrola nepoželjnih supstanci u hrani za životinje vrši se u skladu sa metodama datim u Prilogu 5 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Određivanje sastojaka životinjskog porijekla u hrani za životinje

Član 8

Sastojci životinjskog porijekla u hrani za životinje određuju se u skladu sa metodama datim u Prilogu 6 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Energetske vrijednosti hrane za živinu

Član 9

Energetske vrijednosti hrane za živinu određuju se u skladu sa Prilogom 7 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Kontrola dodataka hrani za životinje

Član 10

Kontrola dodataka hrani za životinje vrši se u skladu sa metodama datim u Prilogu 8 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Prestanak primjene

Član 11

Danom početka primjene ovog pravilnika prestaje primjena odredaba Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane („Službeni list SFRJ“, broj 15/87), koje se odnose na uzimanja uzoraka stočne hrane i fizičku, hemijsku i mikrobiološku analizu stočne hrane.

Stupanje na snagu

Član 12

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u “Službenom listu Crne Gore”, a primjenjivaće se od 1. jula 2017. godine.

* U ovaj Pravilnik prenijeta je Uredba Komisije (EZ) br. 152/2009 od 27. januara 2009. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službene kontrole hrane za životinje.

Broj: 323-318/16-3

Podgorica, 12. decembra 2016. godine

Ministar,
mr **Milutin Simović**, s.r.

METODE ZA UZIMANJE UZORAKA ZA LABORATORIJSKA ISPITIVANJA HRANE ZA ŽIVOTINJE

Dio I

Način uzimanja uzoraka

Uzorci za kontrolu hrane za životinje uzimaju se u skladu sa metodama kao reprezentativni uzorci.

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

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

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

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

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

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

Dio II

Oprema za uzimanje uzoraka

Oprema za uzimanje uzoraka treba da je izrađena od materijala koji ne može kontaminirati proizvode namijenjene uzorkovanju.

Oprema koja je namijenjena višestrukoj upotrebi treba da bude jednostavna za čišćenje kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.

Za ručno uzimanje uzoraka čvrste hrane za životinje koristi se sljedeća oprema:

- lopatica sa ravnim dnom i vertikalnim stranicama;
- sonda za uzimanje uzoraka sa dugim prorezom ili pregradama.

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

Za mehaničko uzimanje uzoraka hrane za životinje koja je u pokretu može se koristiti odgovarajuća mehanička oprema kojom se može uzorkovati najmanje čitav dio protoka, a uzimanje uzoraka hrane za životinje u pokretu (pri velikim brzinama protoka) može se sprovesti automatizovanom opremom.

Za razdvajanje uzorka na približno jednake dijelove koristi se oprema za pripremu redukovanih uzoraka na reprezentativan način (djeloci) prema potrebi.

Dio III

Količina i broj pojedinačnih uzoraka

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

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

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

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

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

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
≤ 2,5 tone	7
>2,5 tone	Kvadratni korjen iz broja tona od kojeg je napravljen uzorkovani dio prethodno pomnožen sa 20*, do 40 pojedinačnih uzoraka

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

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

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

*-Ako nije moguće dobiti homogenu tečnost, povećava se broj pojedinačnih uzoraka.

1.3. Količina pojedinačnih uzoraka pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno zastupljenih za upakovanu hranu za životinje

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

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

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

151 do 400 jedinica	5 jedinica**
>400 jedinica	Jedna četvrtina kvadratnog korijena iz broja jedinica u uzorkovanom dijelu***, do 40 jedinica
*-U slučaju kada otvaranje jedinice može uticati na analizu (npr. kvarljiva vlažna hrana za životinje), neotvorena jedinica služi kao pojedinačni uzorak.	
**-Za jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kilogram ili jedan litar, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice.	
***-Kad dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.	

1.4 Količina pojedinačnih uzoraka pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno zastupljenih u hrani za životinje u blokovima ili kamenoj soli za lizanje

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

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

1.5 Količina pojedinačnih uzoraka pri kontroli materija ili proizvoda ravnomjerno zastupljenih u vlaknastoj hrani/hranivima

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

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

Količine pojedinačnih uzoraka koriste se za:

- kontrolu aflatoksina, raženih gljivica, ostalih mikotoksina i štetnih botaničkih nečistoća u hrani za životinje;
- kontrola unakrsne kontaminacije sastojkom, uključujući i genetski modificirani materijal, ili materija za koju se očekuje neujednačena distribucija u hrani za životinje.

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

Tabela

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

1.7 Količina pojedinačnih uzoraka kod velikih serija

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

Dio IV KOLIČINA ZBIRNIH UZORAKA

Vrste hrane za životinje za koje je potreban je samo jedan zbirni uzorak		
	Vrsta hrane za životinje	Najmanji veličina zbirnog uzoraka (*) (**)
1.	Hrana za životinje u rasutom stanju	4 kg
2.	Pakovana hrana za životinje	4 kg***
3.	Tečna ili polutečna hrana za životinje	4 l
4.	Krmni blokovi ili kamene soli za lizanje	
1.4.1.	pojedinačne mase veće od 1 kg	4 kg
1.4.2.	pojedinačne mase ne veće od 1 kg	masa četiri originalna bloka ili kamena za lizanje
5.	Vlaknasta hrana/hranivo	4 kg****
*-Ako se uzorkuje hrana za životinje visoke vrijednosti, može se uzeti manja količina zbirnog uzorka pod uslovom da se to opiše i navede u zapisniku o uzimanju uzoraka.		
**-U skladu sa odredbama posebnog propisa o utvrđivanju metoda uzimanja uzoraka i analize za službenu kontrolu hrane za životinje, uzimajući u obzir prisustvo genetski modificiranog materijala za koji je postupak odobravanja u toku ili je odobrenje isteklo, zbirni uzorak za kontrolu prisustva genetski modificiranog materijala mora da sadrži najmanje 35 000 sjemenki/zrna, a veličina zbirnog uzorka za kukuruz mora da bude najmanje 10,5 kg, a za soju 7 kg, a za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, ovas, pirinač, raž, pšenica i sjeme repe, zbirna veličina uzorka od 4 kg odgovara količini od 35 000 sjemenki.		
***-U slučaju upakovane hrane za životinje, možda neće biti moguće postići veličinu od 4 kg za zbirni uzorak, zavisno od veličine pojedinačnih jedinica.		
****-U slučaju vlaknaste hrane ili hrane niske specifične težine (sijeno, slama), zbirni uzorak treba biti najmanje 1 kg.		

Dio V KOLIČINA KONAČNIH UZORAKA ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE

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

čvrsta hrana za životinje	500 g (*) (**) (***)
tečna ili polutečna hrana za životinje	500 ml*
*- Konačni uzorak za kontrolu prisustva genetski modificiranog materijala mora da sadrži najmanje 10 000 sjemenki/zrna, a za kukuruz veličina konačnog uzorka mora biti najmanje 3 000 g, a za soju 2 000 g., a za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, pirinač, raž, pšenica i sjeme	

repe, zbirna veličina uzorka od 500 g odgovara više od 10 000 sjemenki.

******-Ako je zbirni uzorak znatno manji od 4 kg ili litra može se uzeti i manja količina zbirnog uzorka pod uslovom da se opiše i navede u zapisniku o uzimanju uzoraka.

*******-Pri uzimanju uzoraka mahunarki, zrna žitarica i orašastog voća za određivanje ostataka pesticida, najmanja veličina konačnog uzorka iznosi 1 kg u skladu sa propisom kojim se uređuju metode za uzimanje uzoraka za službenu kontrolu ostataka pesticida u i na proizvodima biljnog i životinjskog porijekla.

Dio VI

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

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

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

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

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

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

Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir uzorkovanog dijela.

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

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

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

Dio VII

Statičko uzimanje uzoraka serija koje se prevoze brodom

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

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

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

Dio VIII

Uzimanje uzoraka velikih serija koje se skladište u skladištima

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

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

Dio IX

Uzimanje uzoraka iz skladišnih objekata (silosa)

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

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

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

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

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

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

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

Veličina zbirnog uzorka odgovara čitavoj seriji, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu iz silosa puštenu u prijemni rezervoar za uzimanje uzoraka.

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

Uzimanje uzoraka hrane za životinje u rasutom stanju u zatvorenim posudama

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

Dio X
NAČIN UZIMANJA, PRIPREMANJA I PAKOVANJA UZORAKA

1. Način uzimanja pojedinačnih uzoraka

- 1.1. Uzorci treba da se uzimaju i pripremaju bez nepotrebnog odlaganja uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprječava promjena sastava ili kontaminacija proizvoda, a instrumenti, radne površine i posude za prijem uzoraka treba da budu čisti i suvi.
- 1.2. Pojedinačni uzorci treba da se uzimaju nasumično iz cijelog uzorka i treba da budu približno jednake veličine.
- 1.3. Veličina pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 grama ili 25 grama za vlaknastu hranu ili hranu niske specifične težine.
- 1.4. Ako se uzimanje uzoraka vrši u skladu sa dijelom VI ovog priloga, uzima se manje od 40 pojedinačnih uzoraka, a veličina pojedinačnih uzoraka određuje se prema veličini zbirnog uzorka u skladu sa dijelom IV ovog priloga.
- 1.5. U slučaju uzimanja uzoraka malih serija pakovane hrane za životinje gdje je prema količinskim zahtjevima potrebno uzeti ograničen broj pojedinačnih uzoraka, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kg ili jedan litar.
- 1.6. U slučaju uzimanja uzoraka pakovane hrane za životinje sastavljene od malih jedinica (npr. < 250 g), veličina pojedinačnog uzorka zavisi o veličini jedinice.

2. Način uzimanja uzoraka hrane za životinje u rasutom stanju

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

3. Način uzimanja uzoraka pakovane hrane za životinje

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

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

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

Pojedinačni uzorci se mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja rezervoara.

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

- 5.1. Uzorci tečne ili polutečne hrane za životinje koja nije pogodna za homogenizaciju uzimaju se u skladu sa dijelom III ovog priloga, a uzorci se uzimaju sa različitih nivoa.
- 5.2. Uzorci se mogu uzeti i za vrijeme pražnjenja sadržaja, ali se prva količina mora odbaciti.
- U slučaju iz tač. 5.1 i 5.2 ovog dijela ukupna zapremina uzetih uzorak ne može biti manja od deset litara.

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

- 6.1. Uzorci krmnih blokova ili kamene soli za lizanje uzimaju se u skladu sa dijelom III ovog priloga, a uzorak se može se uzeti kao dio svakog bloka ili kamene soli za lizanje, a u slučaju sumnje da blok ili kamena so za lizanje nije pogodan za homogenizaciju, čitav blok ili kamena so za lizanje može se uzeti kao uzorak.
- 6.2. Za četiri bloka ili kamene soli za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jedne kamene soli za lizanje.

7. Priprema zbirnih uzoraka

Pojedinačni uzorci miješaju se tako da stvore zbirni uzorak.

8. Priprema konačnih uzoraka

Zbirni uzorak treba da se pažljivo izmiješa.¹

Priprema konačnih uzoraka vrši se na sljedeći način:

- uzorak se čuva u pogodnoj posudi/prijemnom rezervoaru, uz preduzimanje mjera opreza kako bi se tokom prevoza ili skladištenja spriječila promjena sastava uzorka ili kontaminacija.
- u slučaju kontrole materija ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, zbirni uzorak može se reprezentativno smanjiti na najmanje 2,0 kg ili 2,0 litra (redukovani uzorak)², po mogućnosti mehaničkim ili automatskim distributerom, za kontrolu prisustva ostataka pesticida u mahunarkama, zrnima žitarica i orašastom voću, najmanja veličina redukovanog uzorka iznosi 3 kg, a ako svojstva hrane za životinje ne dozvoljavaju korišćenje distributera ili distributer nije dostupan, uzorak se smanjuje dijeljenjem na četiri dijela, a iz smanjenih uzoraka pripremaju se konačni uzorci (za potrebe kontrole, službenog postupka i u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu sa dijelom V ovog priloga, a u slučaju kontrole proizvoda, uključujući genetski modifikovani materijal ili materija koje su neravnomjerno raspoređene u hrani za životinje, zbirni uzorak je:

- potpuno homogenizovan i naknadno podjeljen u konačne uzorke ili
- redukovan na najmanje 2 kg ili 2 litra³ mehaničkim ili automatskim distributerom.

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

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

9. Pakovanje uzoraka

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

10. Slanje uzoraka u laboratoriju

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

11. Podaci o uzimanju uzoraka

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

U evidencijama se unosi svako odstupanje od postupka uzimanja uzoraka.

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

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

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

ANALITIČKE METODE ZA PRIPREMU UZORAKA HRANE ZA ŽIVOTINJE ZA LABORATORIJSKO ISPITIVANJE

Dio I

ANALITIČKE METODE ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE

1. Priprema uzoraka za laboratorijsko ispitivanje

Priprema uzoraka hrane za životinje koji se šalju u laboratoriju za ispitivanje vrši se na način da izmjerene količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke.

2. Mjere opreza

Postupak pripremanja uzoraka vrši se u zavisnosti od analitičkih metoda koje će se koristiti, kao i proizvoda i materijala koji se kontrolišu. Potrebni postupci treba da se sprovedu na način kojim se u najvećoj mogućoj mjeri sprječava kontaminacija i promjena sastava uzorka. Mljevenje, miješanje i prosijavanje treba da se vrši bez odlaganja kako bi se uzorak što kraće izlagao vazduhu i svjetloti i ne mogu se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak. Uzorci hrane za životinje treba da se ručno melju ako je osjetljiva na toplotu, a oprema ne smije da bude izvor kontaminacije. Ako se priprema ne može obaviti bez znatne promjene sadržaja vlage u uzorku, sadržaj vlage se određuje prije i nakon pripreme, u skladu sa dijelom I priloga 3 ovog pravilnika.

3. Postupak

3.1 Opšti postupci

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

3.1.1 Hrana za životinje koja se može samljati bez dodatne obrade

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

3.1.2 Hrana za životinje koja se može samljati nakon sušenja

Konačni uzorak se, u skladu sa tačkom 4.3. dijela I priloga 3 ovog pravilnika suši tako da se sadržaj vlage snizi na 8%–12%, a zatim se nastavlja u skladu sa tačkom 3.1.1. ovog dijela.

3.1.3 Tačna ili polutečna hrana za životinje

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

3.1.4 Ostala hrana za životinje

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

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

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

U slučaju mikroskopske provjere, u laboratoriji se može smanjiti zbirni uzorak ili dodatno smanjiti redukovani uzorak.

Konačni uzorci za referentne uzorke uzimaju se na identičan način kao konačni uzorci u postupku kontrole.

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

4. Čuvanje uzoraka

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

Dio II

REAGENSI I OPREMA KOJA SE KORISTI U ANALITIČKIM METODAMA

1. Svi reagensi koji se koriste u analitičkim metodama treba da budu analitičke čistoće (*pro analysi* (p.a.)), a čistoća reagensa treba da se provjeri slijepom probom, u zavisnosti od dobijenih rezultata, može biti potrebno dodatno prečišćavanje reagensa.
2. Prilikom primjene analitičkih metoda koje uključuju pripremanje rastvora, razblaživanje, ispiranje ili pranje, a kod kojih se ne navodi vrsta korišćenog rastvora ili rastvarača, koristi se voda, koja je demineralizovana ili destilovana.
3. Oprema i instrumenti koji se koriste za laboratorijsko ispitivanje treba da budu čisti, posebno kod određivanja vrlo malih količina materija.

Dio III

PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA

1. Postupak ekstrakcije

Ukoliko je analitičkom metodom utvrđen poseban postupak ekstrakcije, osim postupka utvrđenog metodom mogu se koristiti i drugi postupci ekstrakcije, pod uslovom da je efikasnost korišćenog postupka ekstrakcije za analizirani matriks istovjetna sa postupkom navedenim u metodi.

2. Postupak prečišćavanja

Ukoliko je analitičkom metodom utvrđen poseban postupak prečišćavanja, osim postupka utvrđenog metodom mogu se koristiti i drugi postupci prečišćavanja, pod uslovom da je efikasnost korišćenog postupka prečišćavanja za analizirani matriks istovjetna sa postupkom navedenim u metodi.

3. Broj postupaka određivanja

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

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

Prilikom kontrole deklarisanog sadržaja materije ili sastojka, ako se rezultatom prvog određivanja potvrdi označeni sadržaj, odnosno ako je rezultat analize unutar prihvatljivih granica odstupanja od označenog sadržaja, ne sprovode se dodatni postupci određivanja pod uslovom da su korišćeni odgovarajući postupci za obezbjeđivanje kvaliteta.

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

4. Izvještaj o korišćenoj analitičkoj metodi

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

5. Izvještavanje o rezultatima analize

Rezultat analize prikazuje se na način utvrđen analitičkom metodom, a prema potrebi se koriguje u donosu na sadržaj vode u konačnom uzorku prije pripreme.

6. Nesigurnost mjerenja i stepen iskorišćenja pri analizi nepoželjnih materija

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Princip

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

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

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

3.2. Analitička vaga sa preciznošću do 1 mg.

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

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

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

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

4. Postupak

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

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

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

4.1.2. Žitarice i gruba krupica

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.2. Žitarice, brašno, gruba krupica i sitna krupica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3. Prethodno sušenje**4.3.1. Hrana za životinje, osim žitarica**

Čvrsta hrana za životinje sa visokim sadržajem vlage koja se teško drobi treba da se prethodno suši na sljedeći način: u odgovarajuću posudu (npr. aluminijumski tanjir veličine 20×12 cm as rubom 0,5 cm) se izmjeri 50 g neusitnjenog uzorka sa preciznošću od 10 mg (sabijena ili zgusnuta hrana za životinje može se prema potrebi grubo podijeliti).

Ostavi da se suši u sušnici na 60–70 °C, sve dok se sadržaj vlage ne smanji na 8 12%.

Posuda se izvadi iz sušnice, jedan sat hladi bez poklopca u laboratoriji, zatim se izmjeri sa preciznošću od 10 mg, a hrana za životinje se odmah usitni, u skladu sa tačkom 4.1.1. ovog dijela, i suši u skladu sa tač. 4.2.1. ili 4.2.3. ovog dijela, u zavisnosti od vrsti hrane za životinje.

4.3.2. Žitarice

Zrna sa sadržajem vlage većim od 17% moraju se prethodno sušiti na sljedeći način: u odgovarajuću posudu (npr. aluminijumski tanjir veličine 20×12 cm sa rubom 0,5 cm) se izmjeri 50 g neusitnjenog zrna sa preciznošću od 10 mg.

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

Ostavi se da se suši 5 do 7 minuta u sušnici na 130° C.

Posuda se izvadi iz sušnice i 2 sata hladi bez poklopca u laboratoriji, zatim se izmjeri sa preciznošću od 10 mg.

Odmah se usitni, u skladu sa tačkom 4.1.2. ovog dijela, i osuši, u skladu sa tačkom 4.2.2 ovog dijela.

5. Izračunavanje rezultata

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

5.1. Sušenje bez prethodnog sušenja

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

gdje je:

m - početna masa uzorka u gramima

m_0 - masa suvog uzorka u gramima

5.2. Sušenje sa prethodnim sušenjem

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

gdje je:

m - početna masa uzorka u gramima

m_1 - masa uzorka nakon prethodnog sušenja u gramima,

m_2 - masa uzorka nakon usitnjavanja ili mljevenja

m_0 - masa suvog uzorka u gramima

5.3. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prelaziti 0,2% apsolutne vrijednosti vlage.

6. Napomena

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

Dio II

ODREĐIVANJE VLAGE U MASTIMA I ULJIMA ŽIVOTINJSKOG I BILJNOG PORIJEKLA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

3. Oprema

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

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

3.3. Pješčano kupatilo ili električna zagrijana ploča

3.4. Eksikator sa efikasnim sredstvom za sušivanje

3.5. Analitička vaga

4. Postupak

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

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

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

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

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

5. Izračunavanje rezultata

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

$$X = m_1 - m_2 \cdot \frac{100}{m}$$

gdje je:

m - masa uzorka u gramima,

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

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

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

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne treba da prelazi 0,05% apsolutne vrijednosti.

Dio III

ODREĐIVANJE SADRŽAJA SIROVIH PROTEINA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Postupak

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

Destilacija oslobođenog amonijaka vrši se u višku rastvora borne kiseline, nakon čega slijedi titracija rastvorom hlornovodonične ili sumporne kiseline.

3. Reagensi

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

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

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

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

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

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

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

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. Razgradnja

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

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

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

5.2. Destilacija

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

5.2.1. Destilacija u sumpornoj kiselini

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

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

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

5.2.2. Destilacija u bornoj kiselini

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

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

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

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

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

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

5.3. Titracija

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

5.3.1. Sumporna kiselina

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

5.3.2. Borna kiselina

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

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

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

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

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

Napomena:

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

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

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

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

5.4. Slijeпа probа

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

6. Izračunavanje rezultata

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

6.1. Izračunavanje za titraciju sumporne kiseline

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

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

gdje je:

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

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

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

m - masa (g) uzorka.

6.2. Izračunavanje za titraciju borne kiseline

6.2.1. Titracija hlorovodoničnom kiselinom

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

$$\frac{V_1 - V_0 \cdot c \cdot 1,4 \cdot 6,25}{m}$$

gdje je:

m - masa (g) uzorka,

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

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

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

6.2.2. Titracija sa sumpornom kiselinom

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

$$\frac{V_1 - V_0 \cdot c \cdot 2,8 \cdot 6,25}{m}$$

gdje je:

m - masa (g) uzorka,

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

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

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

7. Provjera metode

7.1. Ponovljivost

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

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

7.2. Tačnost

Za analizu (mineralizacija, destilacija, titracija) koristi se 1,5 do 2,0 g acetanilida (tačka 3.13.) u prisustvu 1 g saharoze (tačka 3.14.), a za 1 g acetanilida koristi se 14,80 ml sumporne kiseline (tačka 3.5.) i iskorišćavanje treba da iznosi najmanje 99%.

8. Napomene

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

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

8.2. Ako se sadržaj kivete stvrdnjava, postupak određivanja započinje se iz početka, ali sa količinom sumporne kiseline (tačka 3.4.) koja je veća od sumrne kiseline date u tački 7.2. ovog dijela.

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

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

Dio IV ODREĐIVANJE UREE

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa uree u hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

2. Princip

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

3. Reagensi

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

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

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

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

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

4. Oprema

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

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

4.3. Spektrofotometar

5. Postupak

5.1. Analiza uzorka

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

Dopuni se vodom do oznake, promućka i filtrira.

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

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

5.2. Kalibraciona kriva

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

Pripremi se kalibraciona kriva.

6. Izračunavanje rezultata

Količina uree u uzorku određuju se iz kalibracione krive.

Rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

7. Napomene

7.1. Ako sadržaj uree prelazi 3%, količina uzorka se smanji na 1 g ili se početni rastvor razblaži tako da u 500 ml nema više od 50 mg uree.

7.2. Ako je sadržaj uree nizak, količina uzorka se povećava sve dok je filtrat proziran i bezbojan.

7.3. Ako uzorak sadrži jednostavna azotna jedinjenja, poput aminokisjelina, optička gustina se mjeri na 435 nm.

Dio V ODREĐIVANJE ISPARLJIVIH AZOTNIH BAZA

I MIKRODIFUZIJA

1. Predmet i područje primjene

Ova metoda se koristi za određivanje sadržaja isparljivih azotnih baza u hrani za životinje izraženog kao amonijak.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje vodom, a rastvor se izbistri i filtrira. Isparljive azotne baze istiskuju se mikrodifuzijom upotrebom rastvora kalijum karbonata, prikupe u rastvor borne kisjeline i titiraju sumpornom kiselinom.

3. Reagensi

3.1. Trihlorsirćetena kisjelina, rastvor 20% (m/v).

3.2. Indikator: rastvori se 33 mg bromkrezol zelenog i 65 mg metil crvenog u 100 ml etanola 95 – 96% (v/v).

3.3. Rastvor borne kisjeline: u sudu od 1 litra rastopi se 10 g borne kisjeline u 200 ml etanola 95–96 % (v/v) i 700 ml vode i doda se 10 ml indikatora (tačka 3.2.). Promiješa se, a prema potrebi boja rastvora promijeni u svijetlo crvenu dodavanjem rastvora natrijum hidroksida. Količina od 1 ml rastvora vezače sa najviše 300 µg NH₃.

3.4. Zasićeni rastvor kalijum karbonata: u 100 ml vrele vode rastvori se 100 g kalijum karbonata. Ostavi se da se ohladi, a zatim se filtrira.

3.5. Sumporna kisjelina, 0,01 mol/l.

4. Oprema

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

4.2. Staklene ili plastične Conway-eve posude.

4.3. Mikrobirete graduisane sa podjelom 1/100 ml.

5. Postupak

Izmjeri se 10 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 ml vode u sud zapremine 200 ml. Mučka se ili miješa 30 minuta u rotacionoj mješalici i doda se 50 ml rastvora trihlorsirćetne kisjeline (tačka 3.1.), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i filtrira kroz nabrani filter.

Pipetom se doda 1 ml rastvora borne kisjeline (tačka 3.3.) u srednji dio Conway-eve posude i 1 ml filtrata uzorka u gornji dio posude i djelimično se pokrije podmazanim poklopcem.

U gornji dio posude brzo se nakapa 1 ml zasićenog rastvora kalijum karbonata (tačka 3.4.) i poklopac hermetički zatvori.

Posuda se oprezno okreće u vodoravnoj ravni tako da se reagensi pomiješaju i ostavi se najmanje četiri sata na sobnoj temperaturi ili jedan sat na temperaturi 40 °C.

Mikrobiretom (tačka 4.3.) se isparljive baze u rastvoru borne kisjeline titruju sumpornom kiselinom (tačka 3.5.).

Slijepa proba se izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

6. Izračunavanje rezultata

1 ml H₂SO₄ 0,01 mol/l odgovara 0,34 mg amonijaka.

Rezultat analize iskazuje se kao procentni sadržaj uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći:

— 10% relativne vrijednosti za sadržaj amonijaka manji od 1,0%,

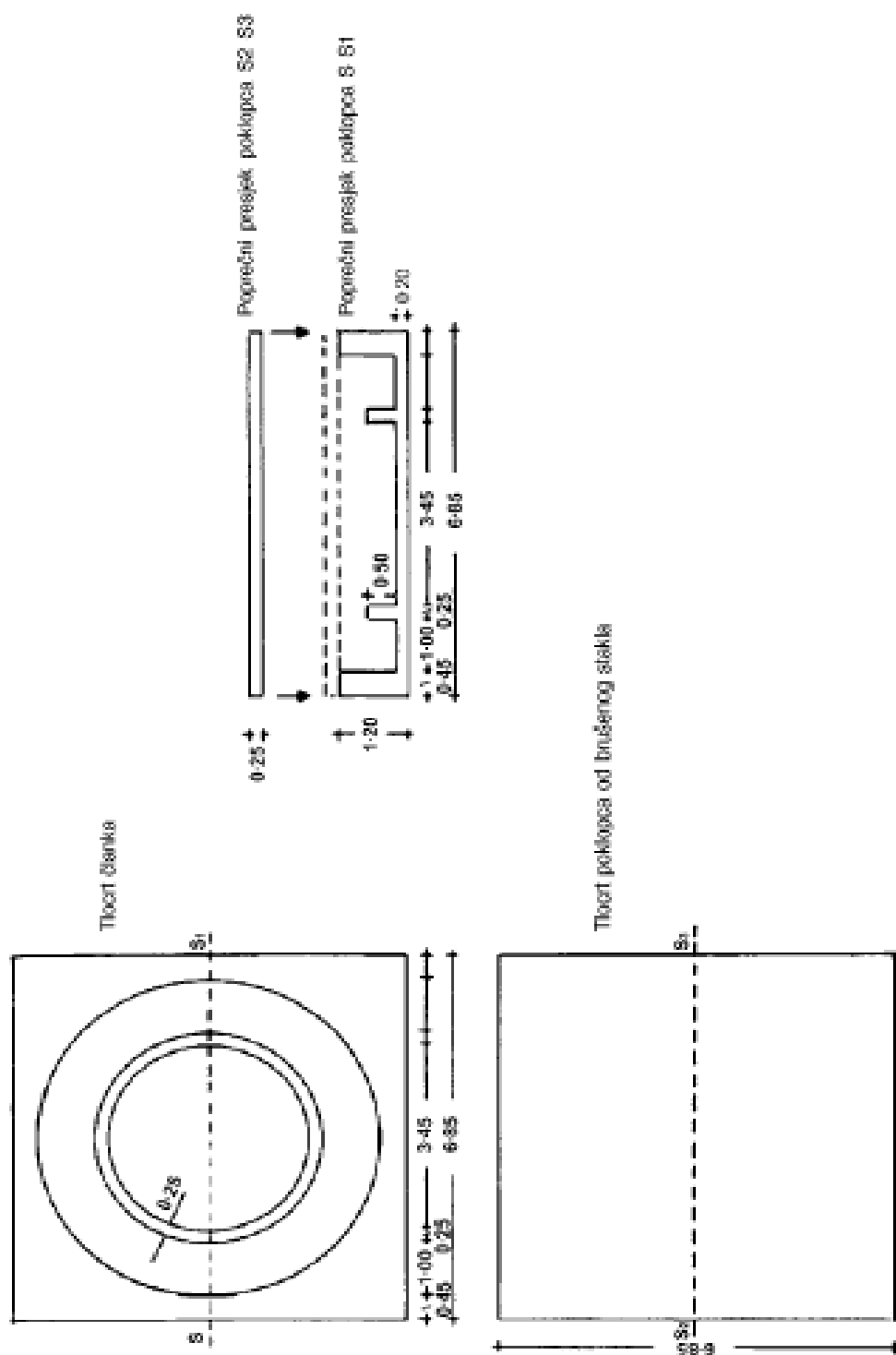
— 0,1% apsolutne vrijednosti za sadržaj amonijaka 1,0% ili veći.

7. Napomena

Ako je sadržaj amonijaka u uzorku veći od 0,6% početni filtrat se razblaži.

CONWAY-EVA POSUDA

Odnos1/1



II DESTILACIJA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje sadržaja isparljivih azotnih baza, iskazanih kao amonijak, u ribljem brašnu koje praktično ne sadrži ureu vrši se u skladu sa sljedećom metodom, samo za sadržaj amonijaka niži od 0,25%.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje vodom, a rastvor izbistri i filtrira. Isparljive azotne baze se istisnu na temperaturi tačke ključanja dodavanjem magnezijum oksida i prikupe u određenoj količini sumporne kiseline, čiji višak koji se retitruje rastvorom natrijum hidroksida.

3. Reagensi

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

- 3.2. Magnezijum oksid.
3.3. Emulzija protiv pjenušanja (npr. silikon).
3.4. Sumporna kiselina, 0,05 mol/l.
3.5. Rastvor natrijum hidroksida, 0,1 mol/l.
3.6. Rastvor metil crvenog 0,3% u etanolu 95% – 96% (v/v).

4. Oprema

- 4.1. Mješalica (rotacona): približno 35 do 40 obr/min.
4.2. Uređaj za destilaciju po Kjeldahl-u.

5. Postupak

Izmjeri se 10 g uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese sa 100 ml vode u sud zapremine 200 ml.

Mučka se ili miješa 30 minuta na rotacionoj mješalici i doda se 50 ml rastvora trihlorsirćetne kiseline (tačka 3.1.), dopuni vodom do oznake, snažno protrese i filtrira kroz nabrani filter papir.

Pipetom se prenese količina bistrog filtrata koja odgovara očekivanom sadržaju isparljivih azotnih baza (obično je dovoljno 100 ml).

Razblaži se na 200 ml, doda se 2 g magnezijum oksida (tačka 3.2.) i nekoliko kapljica emulzije protiv pjenušanja (tačka 3.3.).

Rastvor mora biti alkalni pri ogledu sa lakmus papirom; ako to nije slučaj, doda se magnezijum oksid (tačka 3.2.).

Postupa se u skladu sa tačkama 5.2. i 5.3. metode analize za određivanje sadržaja sirovih proteina (dio III ovog Priloga).

Slijepa proba se izvodi istim postupkom, ali bez uzorka za analizu.

6. Izračunavanje rezultata

1 ml H_2SO_4 0,05 mol/l odgovara 1,7 mg amonijaka.

Rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći 10% relativne vrijednosti amonijaka.

Dio VI

ODREĐIVANJE AMINOKISJELINA (OSIM TRIPTOFANA)

1. Predmet i područje primjene

Određivanje slobodnih (sintetičkih i prirodnih) i ukupnih (vezanih za peptide i slobodnih) aminokiselina u hrani za životinje pomoću analizatora aminokiselina za sljedeće aminokiseline: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin vrši se u skladu sa sljedećom metodom.

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

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

2. Princip

2.1. Slobodne aminokiseline

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

Vrijednost pH filtriranog rastvora podesi se na 2,20.

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

2.2. Ukupne aminokiseline

Odabir postupka zavisi od ispitivanih aminokiselina.

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

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

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

Vrijednost pH hidrolizata podesi se na 2,20.

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

3. Reagensi

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

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

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

3.3. Fenol.

3.4. Natrijum disulfat.

3.5. Natrijum hidroksid.

3.6. 5-sulfosalicilna kiselina dihidrat.

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

3.8. Trinatrijum citrat dihidrat.

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

3.10. Natrijum hlorid.

3.11. Ninhidrin.

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

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

3.14. Gasoviti azot (<10 ppm kiseonika).

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokiseline.

3.16.1. Standardne materije iz tačke 1. Čista jedinjenja koja ne sadrže kristalnu vodu. Prije upotrebe suše se 1 nedelju pod vakuumom sa P_2O_5 ili H_2SO_4 .

3.16.2. Cisteinska kiselina.

3.16.3. Metionin-sulfon.

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

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

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

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

3.19. Mravlja kiselina – rastvor fenola:

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

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

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

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

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

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

3.23. Oksidaciona smjesa (peroksimravlja kiselina – fenol):

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

Upozorenje: Izbjegavati dodir sa kožom i nositi zaštitnu odjeću.

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

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

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

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

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

3.27.1. Osnovni standardni rastvor aminokisjelina (tačka 3.16.1.).
c = 2,5 µmol/ml za svaku u hlorovodoničnoj kiselini.

3.27.2. Osnovni standardni rastvor cisteinske kiseline i metionin-sulfona, c = 1,25 µmol/ml.
U sudu zapremine 1 l rastvori se 0,2115 g cisteinske kiseline (tačka 3.16.2.) i 0,2265 g metionin-sulfona (tačka 3.16.3.) u citratnom puferu (tačka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do oznake i može se čuvati najduže 12 mjeseci na temperaturi nižoj od 5° C i ne koristi se ako osnovni standardni rastvor (tačka 3.27.1.) sadrži cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon.

3.27.3. Osnovni standardni rastvor internog standarda, npr. norleucina, c = 20 µmol/ml.
U posudi se rastvori 0,6560 g norleucina (tačka 3.13.) u citratnom puferu (tačka 3.24.) i dopuni citratnim puferom do 250 ml i može se čuvati najduže šest mjeseci na temperaturi nižoj od 5° C.

3.27.4. Kalibraconi rastvor standardnih aminokisjelina koji se koristi sa hidrolizatima, c = 5 nmol/50 µl za cisteinsku kiselinu i metionin-sulfon i c = 10 nmol/50 µl za druge aminokiseline.
U čaši zapremine 100 ml rastvori se 2,2 g natrijum hlorida (tačka 3.10.) sa 30 ml citratnog pufera (tačka 3.24.) i doda se 4,00 ml osnovnog standardnog rastvora aminokisjelina (tačka 3.27.1.), 4,00 ml osnovnog standardnog rastvora cisteinske kiseline i metionin-sulfona (tačka 3.27.2.) i 0,50 ml osnovnog standardnog rastvora internog standarda (tačka 3.27.3.) ako se isti koristi, vrijednost pH se podesi natrijum hidroksidom na 2,20 (tačka 3.18.). Sadržaj se kvantitativno prenese u sud zapremine 50 ml, dopuni citratnim puferom (tačka 3.24.) do oznake i promiješa.
Čuva se najduže tri mjeseca na temperaturi nižoj od 5° C.

3.27.5. Pripremi se kalibracioni rastvor standardnih aminokisjelina koji se koristi sa hidrolizatima u skladu sa tačkom 5.3.3.1. ovog dijela, a za ekstrakte u skladu sa tačkom 5.2. ovog dijela, a kalibracioni rastvor se pripremi u skladu sa tačkom 3.27.4. ovog dijela, ali bez natrijum hlorida.
Čuva se najduže 3 mjeseca na temperaturi nižoj od 5° C.

4. Oprema

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

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

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

4.4. pH metar (na tri decimalna mjesta).

4.5. Membranski filter (0,22 µm).

4.6. Centrifuga.

4.7. Rotacioni vakuumi uparivač.

4.8. Mehanička mučkalica ili magnetna mješalica.

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

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

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

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

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

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

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

5.2. Određivanje slobodnih aminokisjelina u hrani za životinje i premiksima

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Određivanje ukupnih aminokisjelina

5.3.1. Oksidacija

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

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

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

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

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

5.3.2. Hidroliza

5.3.2.1. Hidroliza oksidovanih uzoraka

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

5.3.2.2. Hidroliza neoksidovanih uzoraka

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

5.3.2.3. Otvorena hidroliza

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

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

5.3.2.4. Zatvorena hidroliza

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

5.3.3. Podešavanje pH

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Na sobnoj temperaturi podesi se vrijednost pH na 2,20 rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.17.) i zatim rastvorom natrijum hidroksida (tačka 3.18.).

Nastavlja se u skladu sa tačkom 5.3.4 ovog dijela.

5.3.4. Rastvor uzorka za hromatografiju

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

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

5.4. Hromatografija

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sistem mora garantovati razdvajanje lizina od „lizinskih artefakata” i ornitina.

6. Izračunavanje rezultata

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

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

Ako se koristi interni standard pomnoži se sa:

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

gdje je:

A - površina pika hidrolizata ili ekstrakta

B - površina pika standardnog kalibracionog rastvora

C - površina pika hidrolizata ili ekstrakta

D - površina pikova standardnog kalibracionog rastvora, internog standard

M - molarne masa aminokisjeline koja se određuje

c - koncentracija standarda u µmol/ml

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

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

Cistin i cistein se određuju kao cisteinska kisjelina u hidrolizatima oksidovnog uzorka, ali se izračunavaju kao cistin (C₆H₁₂N₂O₄S₂, M 240,30 g/mol) upotrebom molarne mase 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

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

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

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

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

gdje je:

V – zapremina konačnog ekstrakta

7. Vrednovanje metode

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

Srednje vrijednosti u g/kg

Referentni materijal	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Smjesa za brojlere	9,31	3,92	5,08	13,93

	n = 16	n = 18	n = 18	n = 16
Proteinski koncentrat	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16
n = Broj uključenih laboratorija.				

7.1. Ponovljivost

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

Referentni materijal	Unutar laboratorijska standardna devijacija (S_r), iskazana u g/kg			
	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Smjesa za brojere	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Proteinski koncentrat	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.				

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

7.2. Ponovljivost

Rezultati međulaboratorijskog poređenja, prikazani kao standardna devijacija između laboratorija, prikazani su u sljedećim tabelama:

Referentni materijal	Standardna devijacija između laboratorija (S_R) u g/kg			
	Aminokisjelina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Miješana hrana za svinje	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Smjesa za brojere	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Proteinski koncentrat	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.				

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

8. Upotreba referentnih materijala

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

9. Napomene

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

Za sve aminokisjeline treba provjeriti područje linearnog odziva uređaja.

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

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

9.3. Kod primjene metode za hranu za životinje koja sadrži više od 1% hlorida (koncentrat, mineralna hrana za životinje, dodaci hrani za životinje) može doći do preniske procjene sadržaja metionina, što zahtijeva posebnu obradu.

Dio VII ODREĐIVANJE TRIPTOFANA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

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

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

3. Reagensi

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

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

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

3.4. Barijum hidroksid oktahidrat (treba paziti da se Ba(OH)₂ · 8H₂O pretjerano ne izlaže vazduhu kako bi se izbjeglo nastajanje BaCO₃ koji može poremetiti postupak određivanja).

3.5. Natrijum hidroksid.

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

3.7. Hlorovodonična kiselina, ρ₂₀ 1,19 g/ml.

3.8. Metanol, za HPLC.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.17. Standardni rastvor triptofana i internog standarda za kalibraciju:

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

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

3.18. Sirćetna kiselina.

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

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

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

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

4. Oprema

4.1. Oprema za HPLC sa spektrofotometrijskim detektorom.

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

4.3. pH metar.

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

4.5. Membranski filter, 0,45 µm.

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

4.7. Mehanička mućkalica ili magnetna mješalica.

4.8. Vrtložna mješalica.

5. Postupak

5.1. Priprema uzoraka

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

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

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

5.2. Određivanje slobodnog triptofana (ekstrakt)

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

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

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

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

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

5.3. Određivanje ukupnog triptofana (hidrolizat)

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

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

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

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

Prije otvaranja autoklava, temperatura se snizi na malo ispod 100° C. kako bi se spriječila kristalizacija Ba(OH)₂·8H₂O, u toplu smjesu se doda 30 ml vode sobne temperature, lagano se promućka ili promiješa i doda se 2,00 ml koncentrovanog rastvora internog standarda (α-metil-triptofana) (tačka 3.16.), a posude se 15 minuta hlade u vodenom/ledenom kupatilu.

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

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

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

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

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

5.4. Određivanje HPLC-om

Za izokratsko eluiranje se kao smjernice predlažu sljedeći uslovi; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

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

6. Izračunavanje rezultata

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

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

gdje je:

A - površina pika internog standarda, standardni kalibracioni rastvor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Ponovljivost

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

8. Rezultati međulaboratorijske studije

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

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

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

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

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

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

	Uzorak 4 Smjesa pšenice i soje	Uzorak 5 Smjesa pšenice i soje (=uzorak 4) sa dodatim triptofanom (0,457 g/kg1)
L	12	12
n	55	60
Srednja vrijednost [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34

S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

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

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CVr - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CVr - koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

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

	Uzorak 1 Miješana hrana za svinje (CRM 117)	Uzorak 2 Riblje brašno s niskim 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 [%]	4,69	4,11	4,22	1,48

gdje je:

L - broj laboratorija koji su dostavile rezultate

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

S_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

R - obnovljivost

CVr - koeficijent varijacije ponovljivosti u %

CVr - koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

L
n
Srednja vrijednost [g/kg]
S_r [g/kg]

9. Napomene

9.1. Bolje razdvajanje triptofana i α -metil-triptofana može se postići sljedećim hromatografskim uslovima.

Izokratsko eluiranje, nakon kojeg slijedi gradijentno čišćenje kolone:

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

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

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

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

9.3. Barijum hidroksid

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

Dio VIII ODREĐIVANJE SIROVIH ULJA I MASTI

1. Predmet i primjena metode

Određivanje sadržaja sirovih ulja i masti u hrani za životinje vrši se sljedećom metodom, osim analize sjemenki uljarica i uljnog voća.

1.1. Postupak A – Sirova ulja i masti koja se ekstrahuju direktno

Postupak A koristi se za hranu za životinje biljnog porijekla, osim sirovih ulja i masti.

1.2. Postupak B – Ukupna sirova ulja i masti

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

1.3. Tumačenje rezultata

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

2. Princip

2.1. Postupak A

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

2.2. Postupak B

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

3. Reagensi

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

3.2. Natrijum sulfat, bezvodni.

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

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

4. Oprema

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

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

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

5. Postupak

5.1. Postupak A

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

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

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

5.2. Postupak B

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

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

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

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

6. Prikaz rezultata

Masa ostatka iskazuje se kao procentni sadržaj uzorka.

7. Ponovljivost

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

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

8. Napomene

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

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

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

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

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

gdje je:

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

m₂ - masa ostatka nakon druge ekstrakcije u gramima.

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

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

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

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

8.6. Ako je sadržaj sirovih ulja/masti veći od 15%, preporučuje se da se prije hidrolize izvede prethodna ekstrakcija u skladu sa postupkom A i ponovna ekstrakcija u skladu sa postupkom B u zavisnosti od vrste hrane za životinje i vrsti ulja/masti u hrani za životinje.

Dio IX

ODREĐIVANJE SIROVIH VLAKNA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

3. Reagensi

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

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

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

3.4. Aceton.

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

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

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

4. Oprema

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

5. Postupak

Izmjeri se 1 g pripremljenog uzorka sa preciznošću od 1 mg i prenese u lončić (tačka 4.2.) pa se doda 1 g sredstva za filtriranje (tačka 3.3.). Sklopi se grejna jedinica (tačka 4.1.) i filterski lončić (tačka 4.2.), a zatim se valjak (tačka 4.3.) priključi na lončić, a usklobljeni valjak i lončić nalije se 30 ml vrele sumporne kiseline (tačka 3.1.) i prema potrebi nekoliko kapi sredstva protiv stvaranja pjene (tačka 3.2.). Tečnost se zagrijava do ključanja u vremenu od 5 ± 2 minuta i ostavi da snažno ključa tačno 30 minuta. Otvori se slavina na ispusnoj cijevi (tačka 4.1.), sumporna kiselina se pod vakuumom filtrira kroz filterski lončić i ostatak se tri puta uzastopno ispere sa po 30 ml vrele vode, pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suva. Ispusna slavina se zatvori, u sklop cilindar-lončić nalije se 150 ml vrelkog rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.7.) i doda se nekoliko kapi sredstva protiv stvaranja pjene (tačka 3.2.), a tečnost se zagrijava do tačke ključanja u vremenu od 5 ± 2 minuta i ostavi snažno da ključa tačno 30 minuta, filtrira se i ponovi postupak ispiranja kao kod sumporne kiseline. Nakon konačnog ispiranja i sušenja, lončić sa sadržajem se odvoji i priključi na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.) i ostatak u lončiću se pod vakuumom tri puta uzastopno ispere sa po 25 ml acetona (tačka 3.4.), pri čemu treba provjeriti da se nakon svakog ispiranja ostatak filtrira do suva. Lončić se osuši u sušnici na 130°C do konstantne mase, anakon svakog sušenja ohladi se u eksikatoru i brzo izmjeri i stavi u mufolnu peč i zagrijava najmanje 30 minuta na $475\text{--}500^\circ \text{C}$ do konstantne mase (gubitak mase između dva uzastopna mjerenja ne smije preći 2mg). Nakon svakoga grijanja i prije mjerenja, lončić se prvo ohladi u peći, a zatim u eksikatoru. Izvodi se slijepe proba bez uzorka, a gubitak mase pri žarenju ne smije prijeći 4 mg.

6. Izračunavanje rezultata

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

$$X = \frac{m_0 - m_1}{m} \cdot 100$$

gdje je:

m - masa uzorka u gramima,

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

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

7. Ponovljivost

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

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

8. Napomene

- 8.1. Hranu za životinje koja sadrži više od 10% sirovih masti prije analize treba odmastiti petrol etrom (tačka 3.5.). Lončić za filtriranje (tačka 4.2.) sa sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.), a ostatak se pod vakuumom tri puta ispere sa po 30 ml petrol etra, pri čemu treba provjeriti da je ostatak suv, a nakon što se lončić sa sadržajem priključi na grejnu jedinicu (tačka 4.1.), nastavlja se postupak iz tačke 5 ovog dijela.
8.2. Hranu za životinje koja sadrži masti koje se ne mogu direktno ekstrahovati petrol etrom (tačka 3.5.), treba odmastiti u skladu sa tačkom 8.1. i ponovo odmastiti nakon ključanja sa kiselinom, a nakon ključanja sa kiselinom i naknadnog ispiranja, lončić sa sadržajem spoji se na jedinicu za hladnu ekstrakciju (tačka 4.6.) i tri puta ispere sa po 30 ml acetona i tri puta sa po 30 ml petrol etra, filtrira se pod vakuumom i sprovodi postupak u skladu sa tačkom 5 ovog dijela, s tim da postupak započne dodavanjem kalijum hidroksida.
8.3. Ako hrana za životinje sadrži više od 5% karbonata, izraženih kao kalcijum karbonat, lončić (tačka 4.2.) sa izmjerenim uzorkom se priključi na grejnu jedinicu (tačka 4.1.).
Uzorak se tri puta ispere sa po 30 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.6.), a nakon svakog dodavanja, uzorak se ostavi približno jedan minut prije filtriranja i ispere se sa 30 ml vode i postupak nastavi u skladu sa tačkom 5 ovog dijela.
8.4. Ako se koristi uređaj u obliku stalka (nekoliko lončića priključenih na istu grejnu jedinicu), u istoj se seriji ne smiju izvesti dva postupka određivanja na istom uzorku za analizu.
8.5. Ako se kisjeli i bazni rastvori nakon ključanja teško filtriraju, propusti se zbijeni vazduh kroz ispusnu cijev grejne jedinice i nastavi s filtriranjem.
8.6. Temperatura žarenja ne smije preći 500°C kako bi se produžio vijek trajanja staklenih filterskih lončića, zbog čega se mora voditi računa da ne dodeđe do pretjeranog toplotnog šoka između ciklusa grijanja i hlađenja.

Dio X ODREĐIVANJE ŠEĆERA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje količine redukujućih šećera i ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza ili kao saharoza, prema potrebi sa faktorom konverzije 0,95 u krmnim smjesama vrši se prema sljedećoj metodi.

Laktoza se određuje odvojeno i uzima u obzir pri izračunavanju rezultata.

2. Princip

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

3. Reagensi

- 3.1. Rastvor etanola 40% (v/v) gustine: 0,948 g/ml na 20°C , neutralisan prema fenolftaleinu.
3.2. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g glacijalne sirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.
3.3. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Dopuni se vodom do 100 ml.
3.4. Metiloranž, rastvor 0,1% (m/v).
3.5. Hlorovodonična kiselina, 4 mol/l.
3.6. Hlorovodonična kiselina, 0,1 mol/l.
3.7. Rastvor natrijum hidroksida, 0,1 mol/l.
3.8. Luff-Schoorl-ov reagens:
Uz oprezno miješanje, u rastvor natrijum karbonata (tačka 3.8.3.) ulije se rastvor limunske kiseline (tačka 3.8.2.), doda se rastvor bakar sulfata (tačka 3.8.1.), dopuni vodom do 1 litra i ostavi se preko noći i filtrira.
Provjeri se koncentracija dobijenog reagensa (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), pH vrijednost rastvora je približno 9,4.

- 3.8.1. Rastvor bakar sulfata: u 100 ml vode rastvori se 25 g bakara sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) koji ne sadrži gvožđe.
 3.8.2. Rastvor limunske kiseline: u 50 ml vode rastvori se 50 g limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$).
 3.8.3. Rastvor natrijum karbonata: u približno 300 ml tople vode rastvori se 143,8 g bezvodnog natrijum karbonata. Ostavi se da se ohladi.
 3.9. Rastvor natrijum tiosulfata, 0,1 mol/l.
 3.10. Rastvor skroba: u litar ključale vode doda se suspenzija 5 g rastvorljivog skroba u 30 ml vode. Ostavi se 3 minuta da vri, zatim se ohladi i prema potrebi doda 10 mg živinog jodida kao konzervansa.
 3.11. Sumporna kiselina, 3 mol/l.
 3.12. Kalijum jodid, rastvor 30% (m/v).
 3.13. Plovačac u zrnu prokuvan u hlorovodičnoj kiselini, ispran vodom i osušen.
 3.14. 3-metilbutan-1-ol.

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. Ekstrakcija uzorka

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

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

5.2. Određivanje redukujućih šećera

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

5.3. Određivanje ukupnih šećera nakon inverzije

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

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

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

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

5.4. Titracija prema Luff-Schoorl-ovoj metodi

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

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

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

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

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

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

6. Izračunavanje rezultata

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

7. Posebni postupci

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

Homogenizuje se i filtrira, a etanol se ukloni u skladu sa tačkom 5.1. ovog dijela, ako nema dekstriniranog skroba, dopuni se destiliranom vodom do oznake. 7.2. Kod melasa i sirovina za hranu za životinje bogatih šećerom i gotovo potpuno bez skroba (rogač, sušeni rezanci šećerne repe itd.), izmjeri se 5 g i prenese u sud zapremine 250 ml, doda se 200 ml destilirane vode i miješa na rotacionoj mješalici jedan sat ili prema potrebi više.

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

8. Napomene

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

8.2. Razlika između sadržaja ukupnih šećera nakon inverzije, iskazanih kao glukoza, i sadržaja redukujućih šećera, iskazanih kao glukoza, pomnoženo sa 0,95, daje procentni sadržaj saharoze iz tačke 8.3. ovog dijela, a za određivanje sadržaja redukujućih šećera, osim laktoze, mogu se koristiti dvije metode:

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

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

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

Primjer:

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

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

Razlika je 16,6 mg glukoze.

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

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

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

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertovani šećeri $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1

2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

Dio XI ODREĐIVANJE LAKTOZE

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

3. Reagensi

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

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

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

3.4. Luff-Schoorl-ov reagens:

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

Provjeri se koncentracija tako dobijenog reagensa (Cu 0,05 mol/l, Na_2CO_3 1 mol/l), a pH vrijednost rastvora je približno 9,4.

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

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

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

3.5. Plovučac u zmu, prokuvan u hlorovodoničnoj kiselini, ispran i osušen.

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

3.7. Sumporna kiselina, 3 mol/l.

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

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

4. Oprema

Vodeno kupatilo sa termostatom postavljenim na 38–40° C

5. Postupak

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

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

Doda se 2,5 ml rastvora Carrez I (tačka 3.2.) i miješa 30 sekundi, zatim 2,5 ml rastvora Carrez II (tačka 3.3.) i ponovo miješa 30 sekundi i dopuni se vodom do 100 ml, promiješa i filtrira.

Dio filtrata ne veći od 25 ml, koji poželjno sadrži 40 do 80 mg laktoze, pipetom se prenese u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 300 ml, a prema potrebi se dopuni vodom do 25 ml.

Na isti način sprovodi se slijepa proba sa 5 ml suspenzije kvasca (tačka 3.1.).

Sadržaj laktoze se određuje Luff-Schoorl-ovom metodom na sljedeći način: doda se tačno 25 ml Luff-Schoorl-ovog reagensa (tačka 3.4.) i dva zrna plovučca (tačka 3.5.), uz ručno miješanje zagrijava se iznad otvorenog plamena srednje jačine tako da tečnost proklučava za približno dva minuta.

Erlenmeyerova tikvica se odmah postavi na žičanu mrežicu presvučenu azbestom sa otvorom prečnika 6 cm, ispod kojeg se upali plamen, plamen se namjesti tako da se zagrijava samo dno Erlenmeyerove tikvice, na Erlenmeyerovu tikvicu se priključi kondenzator sa povratnim protokom, ostavi se da klučava tačno 10 minuta i odmah se ohladi u hladnoj vodi i nakon približno pet minuta titruje na sljedeći način:

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

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

6. Izračunavanje rezultata

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

Rezultat se iskazuje kao procenat sadržaja bezvodne laktoze u uzorku.

7. Napomena

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

**Tabela vrijednosti za 25 ml Luff-Schoorlovog reagensa
ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l, dva minuta zagrijavanja, 10 minuta ključanja**

$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, invertirani šećeri $C_6H_{12}O_6$		Laktoza $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltoza $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6

7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

Dio XII ODREĐIVANJE SKROBA POLARIMETRIJSKA METODA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

Metoda iz tačke 1 ovog dijela obuhvata dva postupka određivanja.

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

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

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

3. Reagensi

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

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

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

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

3.4. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida $K_4[Fe(CN)_6] \cdot xH_2O$. Dopuni se vodom do 100 ml.

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

4. Oprema

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

4.2. Polarimetar ili saharimetar.

5. Postupak

5.1. Priprema uzorka

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

5.2. Određivanje ukupne optičke rotacije (P ili S)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Izračunavanje rezultata

Sadržaj skroba (%) izračunava se na sljedeći način:

6.1. Mjerenje polarimetrom

$$\text{Sadržaj skroba(\%)} = \frac{2000 \cdot P - P'}{\alpha_D^{20^\circ}}$$

gdje je:

P - ukupna optička rotacija u ugaonim stepenima

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

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

+185,9°:	pirinčani skrob;
+185,7°:	krompirov skrob;
+184,6°:	kukuruzni skrob;
+182,7°:	pšenični skrob;

+181,5°:	ječmeni skrob;
+181,3°:	ovseni skrob;
+184,0°:	druge vrste skroba i skrobnih smješa u krmnim smješama

6.2 Mjerenje saharometrom

$$\text{Sadržaj skroba(\%)} = \frac{2000}{\alpha_D^{20^\circ}} \cdot \frac{2N \cdot 0,665 \cdot S - S'}{100} - \frac{26,6N \cdot S - S'}{\alpha_D^{20^\circ}}$$

gdje je:

S - ukupna optička rotacija u stepenima saharometra

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

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

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

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

6.3. Ponovljivost

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

7. Napomene

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

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

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

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

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

Dio XIII ODREĐIVANJE SIROVOG PEPELA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

3. Reagensi

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

4. Oprema

4.1. Grejna ploča.

4.2. Električna mufolna peč sa termostatom.

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

5. Postupak

Izmjeri se približno 5 g uzorka sa preciznošću od 1 mg (2,5 g kod proizvoda koji lako nabubre) i prenese u lončić za spaljivanje koji se prethodno zagrije na 550 °C, ohladi i tarira.

Lončić se postavi na grejnu ploču i postepeno zagrijava sve dok materija ne pocrni i spali se u skladu sa tač. 5.1. ili 5.2. ovog dijela.

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

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

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

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

6. Izračunavanje rezultata

Masa ostatka se izračuna tako da se oduzme tara.

Rezultat se iskazuje kao procentni sadržaj uzorka.

7. Napomene

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

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

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

- nakon trosatnog spaljivanja, pepeo se prenese u toplu vodu i filtrira kroz mali filter bez pepela;
- filter i njegov udio se spale u istom lončiću, a filtrat se prenese u ohlađen lončić, osuši, spali i izmjeri.

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

Dio XIV ODREĐIVANJE PEPELA RASTVORLJIVOG U HLOROVODONIČNOJ KISJELINI

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa mineralnih materija u hrani za životinje, rastvornih u hlorovodoničnoj kisjelinu vrši se sljedećim metodama.

1.1. *Metoda A*: primjenjuje se za organske sirovine za hranu za životinje i većinu krmnih smješa.
1.2. *Metoda B*: primjenjuje se za mineralne krmne smješe i krmne smješe koje, prema metodi A, sadrže više od 1% materija rastvorljivih u hlorovodoničnoj kiselini.

2. Princip

2.1. *Metoda A*: uzorak se spali, pepeo se rastvori u vreloj hlorovodoničnoj kiselini, a rastvorljivi ostatak se filtrira i izmjeri.
2.2. *Metoda B*: uzorak se obradi hlorovodoničnom kiselinom, rastvor se filtrira, ostatak spali, a tako dobijeni pepeo obradi u skladu s metodom A.

3. Reagensi

3.1. Hlorovodonična kiselina, 3 mol/l.
3.2. Trihlorsirćetna kiselina, rastvor 20% (m/v).
3.3. Trihlorsirćetna kiselina, rastvor 1% (m/v).

4. Oprema

4.1. Grejna ploča.
4.2. Električna mufolna peć sa termostatom.
4.3. Lončići za spaljivanje izrađeni od kvarcnog stakla, porculana ili platine, pravougaoni (približno 60×40×25 mm) ili okrugli (promjer: 60 do 75 mm, visina: 20 do 40 mm).

5. Postupak

5.1. Metoda A

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

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

5.2. Metoda B

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

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

6. Izračunavanje rezultata

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

7. Napomena

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

Dio XV ODREĐIVANJE KARBONATA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje količine karbonata u većini hrane za životinje, koji se uobičajeno izražavaju kao kalcijum karbonat, vrši se prema sljedećoj metodi

2. Princip

Karbonati se razlažu u hlorovodoničnoj kiselini; oslobođeni ugljen dioksid se sakupi u građuisanu epruvetu, a njegova zapremina uporedi sa zapreminom koji se pod istim uslovima oslobađa iz poznate količine kalcijum karbonata.

3. Reagensi

3.1. Hlorovodonična kiselina, gustina 1,10 g/ml.
3.2. Kalcijum karbonat.
3.3. Sumporna kiselina, približno 0,05 mol/l, obojena metil crvenim.

4. Oprema

Scheibler-Dietrich-ova aparatura ili druga ekvivalentna aparatura.

5. Postupak

Zavisno od sadržaja karbonata u uzorku izmjeri se dio uzorka:

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

Izmjereni dio uzorka se prenese u posebnu tikvicu (slika 4.) sprave, opremljenu malom epruvetom od nelomljivog materijala u kojoj se nalazi 10 ml hlorovodonične kiseline (tačka 3.1.), pa se tikvica spoji sa aparaturom.

Trosmjerna slavina (5) se okrene tako da je epruveta (1) otvorena prema spolja, pomičnom epruvetom (2), napunjenom obojenom sumpornom kiselinom (tačka 3.3.) i povezanom sa građuisanom epruvetom (1), nivo tečnosti dovede se do oznake nula. Slavina (5) se okrene tako da se spoje epruvete (1) i (3), zatim se provjeri je li nivo na oznaci nula.

Naginjanjem tikvice (4) hlorovodonična kiselina se (tačka 3.1.) polako prelijeva preko uzorka, pritisak se izjednači spuštanjem epruvete (2), a tikvica (4) se mućka sve dok potpuno ne prestane oslobađanje ugljen dioksida.

Ponovo se uspostavi pritisak vraćanjem nivoa tečnosti u epruvetama (1) i (2) na isti nivo, rezultat se očitava nakon nekoliko minuta kada se ustali zapremina gasa.

U istim uslovima se izvede kontrolni ogled sa 0,5 g kalcijum karbonata (tačka 3.2.).

6. Izračunavanje rezultata

Sadržaj karbonata, izraženih kao kalcijum karbonat, izračunava se pomoću sljedeće formule:

$$X = \frac{V \cdot 100}{V \cdot 2m}$$

gdje je:

X - % (m/m) karbonata u uzorku, izraženih kao kalcijum karbonat

V - ml oslobođenog CO₂ iz dijela uzorka

V₁ - ml oslobođenog CO₂ iz 0,5 g CaCO₃

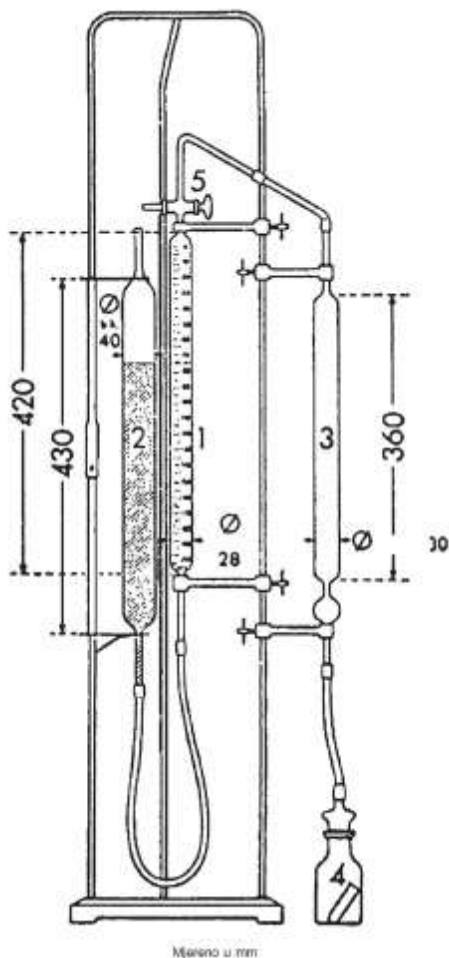
m - masa dijela uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kada je masa dijela uzorka veća od 2 g, prvo se u tikvicu (4) ulije 15 ml destilovane vode i promiješa prije početka ogleda, a za kontrolni ogled se koristi jednaka količina vode.

7.2. Ako se zapremina korišćene aparature razlikuje od obima Scheibler-Dietrich-ove aparature, potrebno je na pogodan način prilagoditi količinu dijelova uzorka i kontrolne materije i izračunavanje rezultata.

Schebler-Deitrichov uređaj za određivanje CO₂



Dio XVI ODREĐIVANJE UKUPNOG FOSFORA FOTOMETRIJSKA METODA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje ukupnog sadržaja fosfora u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi.

2. Princip

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

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

3. Reagensi

3.1. Kalcijum karbonat.

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

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

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

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

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

3.6.1. Rastvor amonijum heptamolibdata: u vrućoj vodi se rastvori 100 g amonijum heptamolibdata ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O), doda se 10 ml amonijaka (gustina 0,91 g/ml) i dopuni vodom do 1 litra.

3.6.2. Rastvor amonijum monovanadata: u 400 ml vruće vode rastvori se 2,35 g amonijum monovanadata (NH₄VO₃). Uz stalno miješanje polako se dodaje 20 ml razblažene azotne kiseline (7 ml HNO₃ (tačka 3.4.) + 13 ml H₂O) i dopuni vodom do 1 litra.

3.7 Standardni rastvor 1 mg fosfora na ml: u vodi se rastvori 4,387 g kalijum dihidrogen fosfata (KH₂PO₄). Dopuni se vodom do 1 litra.

4. Oprema

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

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

4.3. Tikvica po Kjeldahl-u zapremine 250 ml.

4.4. Sudovi i precizne pipete.

4.5. Spektrofotometar

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

5. Postupak

5.1. Priprema rastvora

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

5.1.1. Standardni postupak

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

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

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

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

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

5.2. Nastanak obojenja i mjerenje optičke gustine

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

5.3. Kalibraciona kriva

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

6. Izračunavanje rezultata

Količina fosfora u oglednom uzorku određuje se iz kalibracione krive.

Rezultat se prikazuje kao procentni sadržaj uzorka.

Ponovljivost

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

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

Dio XVII ODREĐIVANJE HLORA IZ HLORIDA

1. Predmet i područje primjene

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

2. Princip

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

3. Reagensi

- 3.1. Rastvor amonijum tiocijanata, 0,1 mol/litra.
- 3.2. Rastvor srebro nitrata, 0,1 mol/l.
- 3.3. Zasićeni rastvor amonijum-gvožđe sulfata (NH₄)Fe(SO₄)₂.
- 3.4. Azotna kiselina, gustina: 1,38 g/ml.
- 3.5. Dietileter.
- 3.6. Aceton.
- 3.7. Rastvor Carrez I: u vodi se rastvori 21,9 g cink acetata Zn (CH₃COO)₂·2H₂O i 3 g glacialnesirćetne kiseline. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.8. Rastvor Carrez II: u vodi se rastvori 10,6 g kalijum ferocijanida K₄Fe(CN)₆·3H₂O. Dopuni se vodom do 100 ml.
- 3.9. Aktivni uglj koji ne sadrži hloride niti ih apsorbuje.

4. Oprema

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

5. Postupak

5.1. Priprema rastvora

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

Istovremeno se izvodi slijepa proba bez uzorka koji se analizira.

5.1.1. Uzorci bez organskih materija

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

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

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

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

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

5.2. Titracija

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

6. Izračunavanje rezultata

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

$$w = \frac{500 \cdot c \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 \cdot m} \text{ IU/kg}$$

gdje je:

V₁ - ml dodatog rastvora srebro nitrata 0,1 mol/l;

V₂ - ml rastvora amonijum tiocijanata 0,1 mol/l korišćenog za titraciju;

m - masa uzorka

Ako se pri slijepoj probi potroši rastvor srebro nitrata 0,1 mol/l, ta se vrijednost oduzme od zapremine (V₁ – V₂).

7. Napomene

7.1 Titracija se može izvesti i potencijometrijskom titracijom.

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

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

METODE ZA KONTROLU NIVOVA DODATAKA HRANI ZA ŽIVOTINJE

Dio I
ODREĐIVANJE VITAMINA A**1. Predmet i područje primjene**

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

Granica kvantifikacije je 2000 IU vitamina A/kg.

2. Princip

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

3. Reagensi

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

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

3.3. Metanol.

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

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

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

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

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

3.8. 2-propanol.

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

3.10. Azot, bez kiseonika.

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

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

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

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

3.13. 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT).

4. Oprema

4.1. Rotacioni vakuum uparivač.

4.2. Laboratorijsko posuđe od tamnog stakla.

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

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

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

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

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

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

4.5. Oprema za HPLC sa sistemom za injektiranje.

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

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

4.6. Spektrofotometar sa kvarcnim kivetama od 10 mm.

4.7. Vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom.

4.8. Uređaj za ekstrakciju koji se sastoji od:

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

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

5. Postupak

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

5.1. Pripremanje uzorka

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

5.2. Saponifikacija

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

5.3. Ekstrakcija

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

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odvajanje (tačka 4.2.3.)

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

Pomiješani ekstrakti se u lijevku za odvajanje dva puta isperu sa 100 ml vode, uz lagano vrtložno mijećanje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz stalno mućkanje sa dodatnim porcijama od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju rastvora fenoltaleina (tačka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani ekstrakt se filtriraju kroz suvi nabrani filter za odvajanje faza (tačka 4.4) u sud zapremine 500 ml (tačka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za odvajanje i filter se isperu sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), sud se dopuni petrol etrom do oznake (tačka 3.2.) i dobro pomiješa.

5.3.2. Ekstrakcija uređajem za ekstrakciju (tačka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje, čep staklenog cilindra (tačka 4.8.1.) se zamijeni uloškom od brušenog stakla (tačka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi se odmah iznad nivoa povezane aparature. Pritiskom koji stvori azot u bočnoj ručici, gornji sloj petrol etra se prenese u lijevak za odvajanje

zapremine 1000 ml (tačka 4.2.3.). U stakleni cilindar se doda 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), začepi i dobro promućka. Pričekava se do razdvajanja slojeva, a gornji sloj se prenese u lijevak za odvajanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), zatim dva puta sa po 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), a slojevi petrol etra dodaju se u lijevak za odvajanje. Pomiješani ekstrakti petrol etra se isperu, u skladu sa tačkom 5.3.1., a zatim se nastavi u skladu sa navedenom tačkom.

5.4. Priprema rastvora uzorka za HPLC

Alikvotni dio rastvora petrol etra (iz tačke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu zapremine 250 ml (tačka 4.2.4.). Rastvor se upari skoro do suva u rotacionom uparivaču (tačka 4.1.) pri sniženom pritisku i temperaturi kupatila do 40° C. Dovođenjem azota uspostavi se atmosferski pritisak (tačka 3.10.), a tikvica se izvadi iz rotacionog uparivača. Preostali rastvor se upari u struji azota (tačka 3.10.), a ostatak odmah rastvori u poznatoj zapremini (10–100 ml) metanola (tačka 3.3.) (koncentracija vitamina A mora biti u rasponu od 5 do 30 IU/ml).

5.5. Određivanje HPLC-om

Vitamin A se razdvaja na koloni C₁₈ sa reverznim fazama (tačka 4.5.1.), koncentracija se izmjeri UV detektorom (325 nm) ili fluorescentnim detektorom (ekscitacija: 325 nm, emisija: 475 nm) (tačka 4.5.2.).

Alikvotni dio (npr. 20 µl) rastvora metanola dobijene u tački 5.4. se injektira i eluira mobilnom fazom (tačka 3.9.). Izračuna se srednja vrijednost visine (površine) pika za više injektiranja istog rastvora uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pikova za više injektiranja kalibracionih rastvora (tačka 5.6.2.).

Uslovi za HPLC

Za HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.5.1.):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 ili 10 µm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.9.):	Smjesa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v+v)
Brzina protoka:	1–2 ml/min
Detektor (tačka 4.5.2.):	UV detektor (325 nm) ili fluorescentni detektor (ekscitacija: 325 nm/emisija: 475 nm)

5.6. Kalibracija

5.6.1. Priprema radnih standardnih rastvora

Pipetom se prenese 20 ml osnovnog rastvora acetata vitamina A (tačka 3.11.1.) ili 20 ml osnovnog rastvora palmitata vitamina A (tačka 3.12.1.) u balon sa ravnom dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.) i hidrolizuje u skladu sa tačkom 5.2., ali bez dodatka BHT-a. Zatim se ekstrahuje sa petrol etrom (tačka 3.2.) u skladu sa tačkom 5.3. i dopuni petrol etrom (tačka 3.2.) do 500 ml. U rotacionom uparivaču se upari 100 ml ovog ekstrakta gotovo do suva, strujom azota (tačka 3.10.) ukloni se preostali rastvor, a ostatak ponovno rastvori u 10,0 ml metanola (tačka 3.3.). Nominalna koncentracija ovog rastvora je 560 IU vitamina A na ml. Tačan sadržaj se određuje u skladu sa tačkom 5.6.3.3. Radni standardni rastvor mora se pripremiti svjež prije upotrebe.

Pipetom se prenese 2,0 ml ovog radnog standardnog rastvora u sud zapremine 20 ml, dopuni metanolom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalna koncentracija takvog razblaženog radnog standardnog rastvora iznosi 56 IU vitamina A na ml.

5.6.2. Priprema kalibracionog rastvora i kalibracione krive

Prenese se 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml razblaženog radnog standardnog rastvora u seriju sudova zapremine 20 ml, dopuni metanolom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2, 8, 5, 6, 14,0 i 28,0 IU vitamina A na ml.

Više puta se injektira 20 µl svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova se konstruiše kalibraciona kriva uzimajući u obzir rezultate UV kontrole (tačka 5.6.3.3.).

5.6.3. UV standardizacija standardnih rastvora

5.6.3.1. Osnovni rastvor acetata vitamina A

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovnog rastvora acetata vitamina A (tačka 3.11.1.) u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ovog razblaženog rastvora acetata vitamina A u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Obračun sadržaja vitamina A:

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

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ za acetat vitamina A = 1530 na 326 nm u 2-propanolu)

5.6.3.2. Osnovni rastvor palmitata vitamina A

Pipetom se prenese 2,0 ml osnovnog rastvora palmitata vitamina A (tačka 3.12.1.) u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 56 IU vitamina A na ml. Pipetom se prenese 3,0 ml ovog razblaženog rastvora palmitata vitamina A u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Obračun sadržaja vitamina A:

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

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

5.6.3.3. Radni standardni rastvor vitamina A

Pipetom se prenese 3,0 ml nerazblaženog radnog standardnog rastvora vitamina A, pripremljenog u skladu sa tačkom 5.6.1. ovog dijela, u sud zapremine 50 ml (tačka 4.2.2.) i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Pipetom se prenese 5,0 ml ovog rastvora u sud zapremine 25 ml i dopuni 2-propanolom (tačka 3.8.) do oznake. Nominalna koncentracija ovog rastvora je 6,72 IU vitamina A na ml. Snimi se UV spektar ovog rastvora prema 2-propanolu (tačka 3.8.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 300 i 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti između 325 i 327 nm.

Obračun sadržaja vitamina A:

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

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

6. Izračunavanje rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova vitamina A iz rastvora uzorka, određuje se koncentracija rastvora uzorka u IU/ml iz kalibracione krive (tačka 5.6.2.).

Sadržaj vitamina A (w) u uzorku, iskazan u IU/kg, izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

c - koncentracija vitamina A (izražena u IU/ml)

V_1 - zapremina rastvora uzorka (tačka 5.4.) u ml

V_2 - zapremina alikvota korišćenog u tački 5.4. ovog dijela, u ml

m - masa uzorka u gramima

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka sa niskom koncentracijom vitamina A može biti korisno sjediniti ekstrakte petrol etra iz dva nezavisna postupka saponifikacije (izmjerena količina: 25 g) u jedan rastvor uzorka za određivanje HPLC-om.

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

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (tačka 3.1.) za razbijanje emulzije.

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

7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrohinon.

7.6. Izomere retinola moguće je razdvojiti uobičajenom faznom kolonom. U tom slučaju, za izračunavanje treba sabrati visine (površine) pikova svih cis i trans izomera.

7.7. Umjesto rastvora natrijum askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto rastvora natrijum sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Pri analizi vitamina A u dodacima mlijeka treba paziti na sljedeće:

- kod saponifikacije (tačka 5.2.): zbog količine masti u uzorku možda će trebati veća količina rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.4.),
- kod ekstrakcije (tačka 5.3.): zbog prisustva emulzija možda će trebati prilagoditi odnos voda/etanol 2:1.

Za provjeru pouzdanosti rezultata dobijenih korištenom analitičkom metodom na ovom specifičnom matriksu (dodatak mlijeka) treba na dodatnom uzorku izvršiti test iskorišćenja. Ako je iskorišćenje manje od 80%, rezultat analize treba korigovati za iskorišćenje.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije preći 15% u odnosu na najviši rezultat.

9. Rezultati međulaboratorijske studije

	Predsmješa	Gotove predsmješe za ishranu životinja	Mineralni koncentrat	Proteinska hrana za životinje	Hrana za prasiće
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
srednja vrijednost [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L - broj laboratorija

n - broj pojedinačnih vrijednosti

s_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

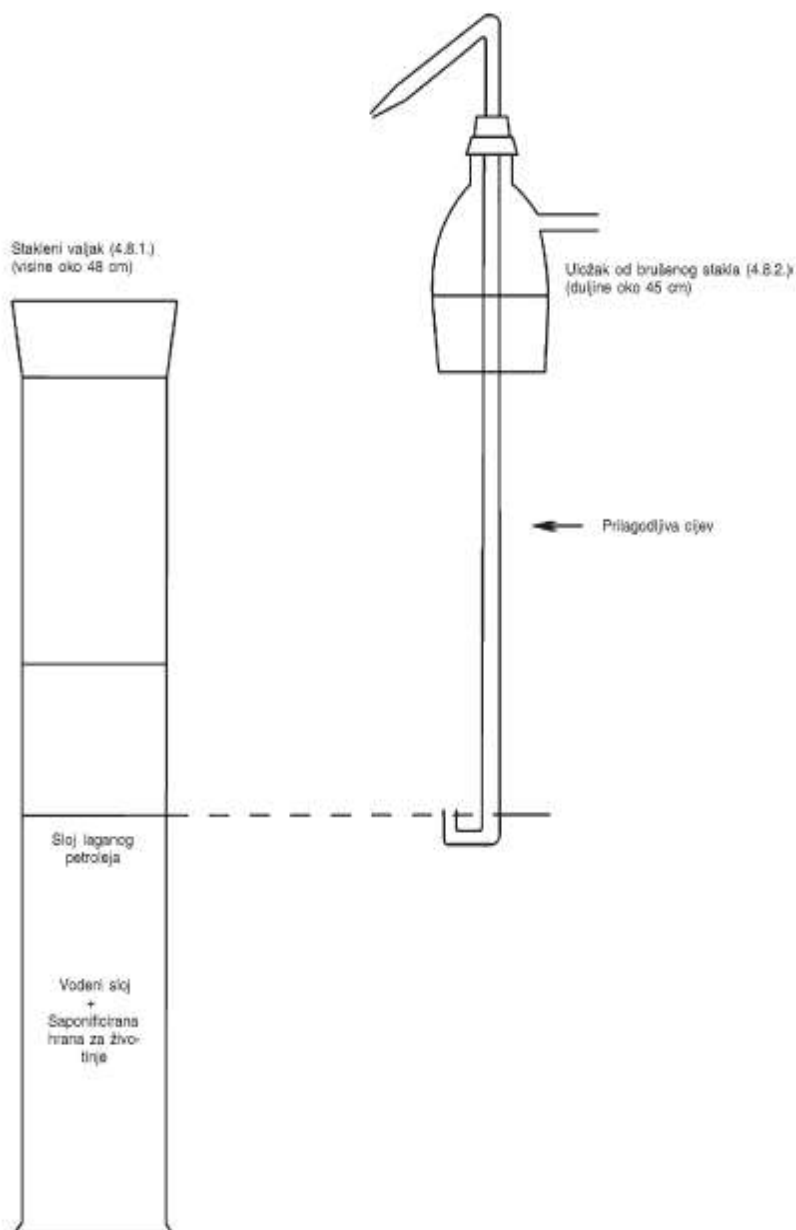
r - ponovljivost

R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



Dio II ODREĐIVANJE VITAMINA E

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa vitamina E u hrani za životinje i predsmešama vrši se prema sljedećoj metodi. Sadržaj vitamina E izražava se u mg DL- α -tokoferol acetata na kg. Količina od 1 mg DL- α -tokoferol acetata odgovara količini od 0,91 mg DL- α -tokoferola (vitamina E).

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

2. Princip

Uzorak se hidrolizuje rastvorom etanol kalijum hidroksida, a vitamin E se ekstrahuje petrol etrom. Rastvor se ukloni uparavanjem, a ostatak rastvori u metanolu i prema potrebi razblaži do tražene koncentracije. Sadržaj vitamina E određuje se reverzno-faznom tečnom hromatografijom visokih performansi (RP-HPLC) i UV ili fluorescentnim detektorom.

3. Reagensi

- 3.1. Etanol, $\sigma=96\%$.
- 3.2. Petrol etar, tačka ključanja 40–60°C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Rastvor kalijum hidroksida, $c=50$ g/100 ml.
- 3.5. Rastvor natrijum askorbata, $c=10$ g/100 ml.
- 3.6. Natrijum sulfid, $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ ($x=7-9$).
- 3.6.1. Rastvor natrijum sulfida, $c=0,5$ mol/l u glicerolu, $\beta=120$ g/l (za $x=9$).
- 3.7. Rastvor fenolftaleina, $c=2$ g/100 ml u etanolu (tačka 3.1.).
- 3.8. Mobilna faza za HPLC: smješa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v+v). Tačan odnos se određuje u skladu sa osobinama korišćene kolone.
- 3.9. Azot, bez kiseonika.
- 3.10. DL- α -tokoferol acetat, posebne čistoće, sertifikovane aktivnosti.
- 3.10.1. Osnovni rastvor DL- α -tokoferol acetata: izmjeri se 100 mg DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u etanolu (tačka 3.1.) i dopuni istim rastvorom do oznake. 1 ml ovog rastvora sadrži 1 mg DL- α -tokoferol acetata.

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

3.11.1. Osnovni rastvor DL- α -tokoferola: izmjeri se 100 mg DL- α -tokoferola (tačka 3.10.) sa preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml. Rastvori se u etanolu (tačka 3.1.) i dopuni istim rastvorom do oznake. 1 ml tog rastvora sadrži 1 mg DL- α -tokoferola.

3.12. 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT).

4. Oprema

4.1. Rotacioni vakuum uparivač.

4.2. Laboratorijsko posuđe od tamnog stakla.

4.2.1. Baloni sa ravnim dnom ili konusne tikvice, zapremine 500 ml, sa vratom od brušenog stakla.

4.2.2. Izmjerne tikvice sa brušenim čepovima, sa uskim vratom, zapremine 10 ml, 25 ml, 100 ml i 500 ml.

4.2.3. Lijevci za odvajanje, konusni, zapremine 1000 ml, sa brušenim čepovima.

4.2.4. Kruškaste tikvice, zapremine 250 ml, sa brušenim čepovima.

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

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

4.5. Oprema za HPLC sa sistemom za injektiranje.

4.5.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 250 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 5 ili 10 μ m ili ekvivalentna.

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

4.6. Spektrofotometar sa kvarcnim kivetama od 10 mm.

4.7. Vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom.

4.8. Uređaj za ekstrakciju (slika 1.) koji se sastoji od:

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

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

5. Postupak

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

5.1. Priprema uzorka

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

5.2. Saponifikacija

U zavisnosti od sadržaja vitamina E, izmjeri se 2–25 g uzorka sa preciznošću od 0,01 g i prenese u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.). Uz stalno vrtložno miješanje, jedno za drugim se dodaje 130 ml etanola (tačka 3.1.), približno 100 mg BHT-a (tačka 3.12.), 2 ml rastvora natrijum askorbata (tačka 3.5.) i 2 ml rastvora natrijum sulfida (tačka 3.6.). Na balon se priključi kondenzator (tačka 4.3.) i balon potopi u vodeno kupatilo sa magnetnom mješalicom (tačka 4.7.). Zagrije se do ključanja i 5 minuta ostavi uz refluks. Kroz kondenzator (tačka 4.3.) se doda 25 ml rastvora kalijum hidroksida (tačka 3.4.) i ostavi uz refluks sljedećih 25 minuta, uz miješanje pod laganom strujom azota. Zatim se kondenzator ispere sa približno 20 ml vode, a udio balona ohladi na sobnoj temperaturi.

5.3. Ekstrakcija

Rastvor za saponifikaciju kvantitativno se prenese dekantiranjem u lijevak za odvajanje kapaciteta 1000 ml (tačka 4.2.3.) ili u uređaj za ekstrakciju (tačka 4.8.), tako što se ispere sa ukupno 250 ml vode. Zatim se balon za saponifikaciju ispere sa 25 ml etanola (tačka 3.1.) i 100 ml petrol etra (tačka 3.2.) i isprana tečnost prenese u lijevak za odvajanje ili uređaj za ekstrakciju. odnos vode i etanola u pomiješanim rastvorima mora biti približno 2:1. Snažno se mućka 2 minuta, zatim ostavi stajati 2 minuta.

5.3.1. Ekstrakcija lijevkom za odvajanje (tačka 4.2.3.)

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

Pomiješani ekstrakti u lijevku za odvajanje isperu se dva puta sa 100 ml vode, uz lagano vrtložno mijepanje (kako bi se spriječio nastanak emulzija), zatim uz ponavljano mućkanje sa dodatnim porcijama od po 100 ml vode, sve dok voda pri dodavanju rastvora fenolftaleina (tačka 3.7.) ne ostane bezbojna (obično je dovoljno četiri ispiranja). Isprani ekstrakt se filtrira kroz suvi nabrani filter za odjeljivanje faza (tačka 4.4.) u sud zapremine 500 ml (tačka 4.2.2.) kako bi se uklonila preostala voda. Lijevak za razdvajanje i filter se isperu sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), dopuni se petrol etrom (tačka 3.2.) do oznake i dobro promiješa.

5.3.2. Ekstrakcija uređajem za ekstrakciju (tačka 4.8.)

Kada se slojevi razdvoje, zamijeni se čep staklenog valjka (tačka 4.8.1.) uloškom od brušenog stakla (tačka 4.8.2.), a donji dio prilagodljive cijevi u obliku slova U postavi odmah iznad nivoa vezane aparature. Pritiskom koji stvara azot u bočnoj ručici gornji sloj petrol etra se prenese u lijevak za odvajanje kapaciteta 1000 ml (tačka 4.2.3.). U stakleni cilindar se doda 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), začepi i dobro promućka. Pričekava se do razdvajanja slojeva, pa se gornji sloj prenese u lijevak za odvajanje kao i prije. Postupak ekstrakcije se ponovi sa 100 ml petrol etra (tačka 3.2.), zatim dva puta sa 50 ml petrol etra (tačka 3.2.), a slojevi petrol etra se dodaju u lijevak za odvajanje.

Pomiješani ekstrakti petrol etra se isperu, u skladu sa tačkom 5.3.1., zatim se nastavi u skladu sa uputstvima u navedenoj tački.

5.4. Priprema rastvora uzorka za HPLC

Alikvotni dio rastvora petrol etra (iz tačke 5.3.1. ili 5.3.2.) prenese se pipetom u kruškastu tikvicu zapremine 250 ml (tačka 4.2.4.). rastvor se upari skoro do suva u rotacionom uparivaču (tačka 4.1.) pri sniženom pritisku i temperaturi kupatila do 40° C. Dovođenjem azota (tačka 3.9.) uspostavi se atmosferski pritisak, a tikvica izvadi iz rotacionog uparivača. Preostali rastvor se ukloni strujom azota (tačka 3.9.), a ostatak odmah rastvori u poznatoj zapmini (10–100 ml) metanola (tačka 3.3.) (koncentracija DL- α -tokoferola mora biti u području 5 μ g/ml do 30 μ g/ml).

5.5. Određivanje putem HPLC-a

Vitamin E se razdvaja na koloni C₁₈ sa reverznim fazama (tačka 4.5.1.), a koncentracija izmjeri fluorescentnim detektorom (ekscitacija: 295 nm, emisija: 330 nm) ili UV detektorom (292 nm) (tačka 4.5.2.).

Alikvotni dio (npr. 20 μ l) rastvora metanola dobijen u tački 5.4. se injektira i eluira mobilnom fazom (tačka 3.8.). Izračunava se srednja vrijednost visina (površina) pikova za više injektiranja istog rastvora uzorka i srednje vrijednosti visina (površina) pikova za više injektiranja kalibracionih rastvora (tačka 5.6.2.).

Uslovi za HPLC

Slijedeći uslovi predlažu se kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati. Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.5.1.):	250 mm $\times$ 4 mm, C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 ili 10 μ m ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.8.):	Smješa metanola (tačka 3.3.) i vode, npr. 980+20 (v)
Brzina protoka:	1 – 2 ml/min
Detektor (tačka 4.5.2.):	Fluorescentni detektor (ekscitacija: 295 nm/emisija: 330 nm) ili UV detektor (292 nm)

5.6 Kalibracija (DL- α -tokoferol acetat ili DL- α -tokoferol)

5.6.1 Standardni DL- α -tokoferol acetat

5.6.1.1 Priprema radnog standardnog rastvora

Pipetom se prenese 25 ml osnovnog rastvora DL- α -tokoferol acetata (tačka 3.10.1.) u balon sa ravnim dnom ili konusnu tikvicu zapremine 500 ml (tačka 4.2.1.) i hidrolizuje, u skladu sa tačkom 5.2. Zatim se ekstrahuje petrol etrom (tačka 3.2.) u skladu sa tačkom 5.3. i petrol etrom dopuni do 500 ml. U rotacionom uparivaču osuši se 25 ml tog ekstrakta gotovo do suva, strujom azota ukloni preostali rastvor (tačka 3.9.), a ostatak se ponovo rastvori u 25,0 ml metanola (tačka 3.3.). Nominalna koncentracija tog rastvora iznosi 45,5 μ g DL- α -tokoferola na ml, što je ekvivalentno 50 μ g DL- α -tokoferol acetata na ml. Radni standardni rastvor treba pripremiti svjež prije upotrebe.

5.6.1.2. Priprema kalibracijskog rastvora i kalibracijske krive

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radnog standardnog rastvora u seriju sudova zapremine 20 ml, metanolom (tačka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol acetata, tj. 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 µg/ml DL-α-tokoferola. Više puta se injektira 20 µl svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih vrijednosti visine (površina) pikova se pripremi kalibraciona kriva.

5.6.1.3. UV standardizacija osnovnog rastvora DL-α-tokoferol acetata (tačka 3.10.1.)

Etanolom se razblaži 5,0 ml osnovnog rastvora DL-α-tokoferol acetata (tačka 3.10.1.) na 25,0 ml i snimi UV spektar tog rastvora prema etanolu (tačka 3.1.) na spektrofotometru (tačka 4.6.) između 250 i 320 nm.

Maksimalna apsorpcija je na 284 nm:

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

Za to razblaženje mora se dobiti vrijednost ekstinkcije u rasponu od 0,84 do 0,88.

5.6.2. Standard DL-α-tokoferola

5.6.2.1 Priprema radnog standardnog rastvora

Pipetom se prenese 2 ml osnovnog rastvora DL-α-tokoferola (tačka 3.11.1.) u sud zapremine 50 ml, rastvori u metanolu (tačka 3.3.) i dopuni do oznake metanolom. Nominalna koncentracija ovog rastvora iznosi 40 µg DL-α-tokoferola na ml, što je ekvivalentno 44,0 µg DL-α-tokoferol acetata na ml. Radni standardni rastvor mora se pripremiti svjež prije upotrebe.

5.6.2.2. Priprema kalibracionog rastvora i kalibracione krive

Prenese se 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml radnog standardnog rastvora u seriju sud zapremine 20 ml, metanolom (tačka 3.3.) dopuni do oznake i promiješa. Nominalne koncentracije ovih rastvora iznose 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg/ml DL-α-tokoferola, tj. 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol acetata.

Više puta se injektira 20 µl svakog kalibracionog rastvora i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Iz srednjih se vrijednosti visina (površina) pikova pripremi kalibraciona kriva.

5.6.2.3. UV standardizacija osnovnog rastvora DL-α-tokoferola (tačka 3.11.1.)

Etanolom se razblaži 2,0 ml osnovnog rastvora DL-α-tokoferola (tačka 3.11.1.) na 25,0 ml te se snimi UV spektar ovog rastvora prema etanolu (tačka 3.1.) u spektrofotometru (tačka 4.6.) između 250 i 320 nm. Maksimalna apsorpcija je na 292 nm:

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

Za to razblaženje mora se dobiti vrijednost ekstinkcije od 0,6.

6. Izračunavanje rezultata

Iz srednje vrijednosti visine (površine) pikova vitamina E iz rastvora uzorka se određuje koncentracija rastvora uzorka u µg/ml (izračunana kao α-tokoferol acetat) iz kalibracione krive (tačka 5.6.1.2. ili 5.6.2.2.).

Sadržaj vitamina E (w) u mg/kg u uzorku izračunava se pomoću sljedeće formule:

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

gdje je:

c - koncentracija vitamina E (kao α-tokoferol acetata u rastvoru uzorka (tačka 5.4.) u µg/ml

V_1 - zapremina rastvora uzorka (tačka 5.4.) u ml;

V_2 - zapremina alikvota korištenog u tački 5.4., u ml;

m - masa uzorka u gramima.

7. Napomene

7.1. Kod uzoraka sa niskom koncentracijom vitamina E može biti korisno pomiješati ekstrakte petroletra iz dvije zavisna posupka saponifikacije (izmjerena količina: 25 g) u jedan rastvor uzorka za određivanje HPLC-om.

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

7.3. Ako se faze ne razdvoje, doda se približno 10 ml etanola (tačka 3.1.) za razbijanje emulzije.

7.4. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja rastvora DL-α-tokoferol acetata ili rastvora DL-α-tokoferola u skladu sa tačkom 5.6.1.3. ili 5.6.2.3., doda se približno 10 mg BHT-a (tačka 3.12.) u rastvor (tačka 3.10.1. ili 3.10.2.), a rastvor čuva u frižideru (može se držati najduže 4 nedjelje).

7.5. Umjesto BHT-a može se koristiti hidrohinon.

7.6. Običnom faznom kolonom može se razdvojiti α-, β-, γ- i δ-tokoferol.

7.7. Umjesto rastvora natrijum askorbata može se koristiti približno 150 mg askorbinske kiseline.

7.8. Umjesto rastvora natrijum sulfida može se koristiti približno 50 mg EDTA.

7.9. Acetat vitamina E se u baznim uslovima vrlo brzo hidrolizuje, zato je vrlo osjetljiv na oksidaciju, posebno u prisustvu elemenata u tragovima, poput gvožđa i bakra. Postupak određivanja vitamina E u premiksima sa nivoima višim od 5 000 mg/kg može dovesti do razgradnje vitamina E. Zbog toga se za potvrdu preporučuje metoda HPLC sa enzimskom razgradnjom struktura vitamina E bez alkalne saponifikacije.

8. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva paralelna postupaka određivanja, izvedena na istom uzorku, ne smije prijeći 15% najvišeg rezultata.

9. Rezultati međulaboratorijske studije¹

	Predsmješa	Gotove predsmješe za ishranu životinja	Mineralni koncentrat	Proteinska hrana za životinje	Hrana za prasiće
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
srednja vrijednost [IU/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [IU/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [IU/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S_R [IU/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [IU/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L - broj laboratorija

n - broj pojedinačnih vrijednosti

s_r - standardna devijacija ponovljivosti

S_R - standardna devijacija obnovljivosti

r - ponovljivost

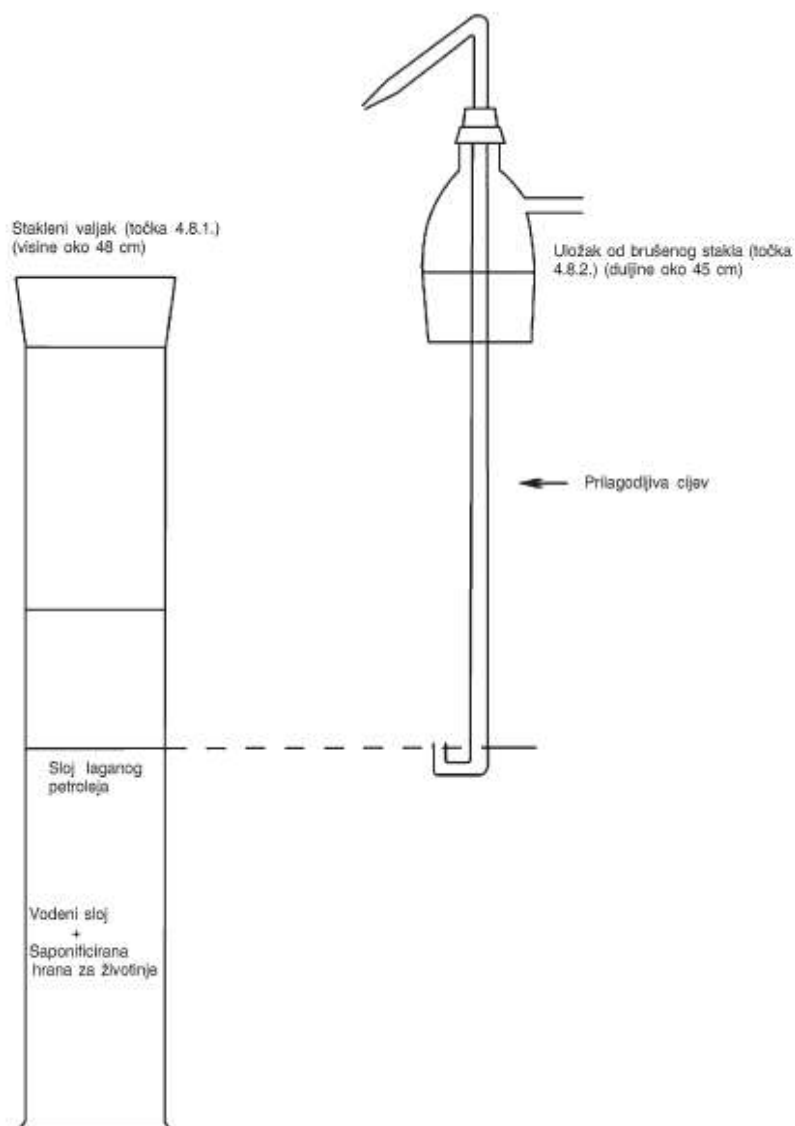
R - obnovljivost

CV_r - koeficijent varijacije ponovljivosti

CV_R - koeficijent varijacije obnovljivosti

¹ - Studija za stočnu hranu pri Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Slika 1.: Uređaj za ekstrakciju (točka 4.8.)



Dio III ODREĐIVANJE GVOŽĐA, BAKRA, MANGANA I CINKA U TRAGOVIMA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje gvožđa, bakra, mangana i cinka u tragovima u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granice za kvantifikaciju su:

- gvožđe (Fe): 20 mg/kg
- bakar (Cu): 10 mg/kg
- mangan (Mn): 20 mg/kg
- cink (Zn): 20 mg/kg.

2. Princip

Nakon razgradnje eventualno prisutnih organskih materija uzorak se rastvori u hlorovodoničnoj kiselini. Nakon pogodnog razblaženja, atomskom apsorpcijskom spektrometrijom određuju se elementi gvožđe, bakar, mangan i cink.

3. Reagensi

Uvodne napomene

Za pripremanje reagenasa i rastvora za analizu koristi se voda bez katjona koje treba odrediti, dobijena dvostrukom destilacijom vode u destilatoru od borosilikatnog ili kvarcnog stakla ili dvostrukom obradom jonsko-izmjenjivačkom smolom.

Reagensi moraju biti najmanje analitičke čistoće. Odsutnost elementa koji se određuje provjerava se slijepom probom. Prema potrebi se reagensi moraju dodatno prečistiti.

Umjesto dolje navedenih standardnih rastvora mogu se koristiti komercijalni standardni rastvori pod uslovom da imaju garanciju i da se prije upotrebe provjere.

3.1. Hlorovodonična kiselina (d: 1,19 g/ml).

3.2. Hlorovodonična kiselina (6 mol/l).

3.3. Hlorovodonična kiselina (0,5 mol/l).

3.4. Fluorovodonična kiselina 38–40% (v/v) sa sadržajem gvožđa (Fe) manjim od 1 mg/l i ostatkom nakon iparavanja manjim od 10 mg/l (u obliku sulfata).

3.5. Sumporna kiselina (g: 1,84 g/ml).

3.6. Vodonik peroksid (približno 100 zapreminskih dijelova kiseonika (30% po masi)).

3.7. Standardni rastvor gvožđa (1000 µg Fe/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor: rastvori se 1 g gvožđeve žice u 200 ml hlorovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.), doda 16 ml vodonik peroksida (tačka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litra.

3.7.1. Radni standardni rastvor gvožđa (100 µg Fe/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.7.) sa 9 dijelova vode.

3.8. Standardni rastvor bakra (1 000 µg Cu/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:

- rastvori se 1 g bakra u prahu u 25 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.), doda 5 ml vodonik peroksida (tačka 3.6.) i dopuni vodom do 1 litra.
- 3.8.1. Radni standardni rastvor bakra (10 µg Cu/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.8.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.
- 3.9. Standardni rastvor mangana (1 000 µg Mn/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:
 - rastvori se 1 g mangana u prahu u 25 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.
- 3.9.1. Radni standardni rastvor mangana (10 µg Mn/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.9.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.
- 3.10. Standardni rastvor cinka (1 000 µg Zn/ml), pripremljen na sljedeći način ili ekvivalentni komercijalni dostupni rastvor:
 - rastvori se 1 g cinka u obliku folije ili listića u 25 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.
- 3.10.1. Radni standardni rastvor cinka (10 µg Zn/ml), pripremljen razblaživanjem 1 dijela standardnog rastvora (tačka 3.10.) sa 9 dijelova vode, zatim razblaživanjem 1 dijela tog rastvora sa 9 dijelova vode.
- 3.11. Rastvor lantan hlrida: rastvori se 12 g lantan oksida u 150 ml vode, doda se 100 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dopuni vodom do 1 litra.

4. Oprema

- 4.1. Mufolna peč sa regulacijom temperature i po mogućnosti pisačem.
- 4.2. Stakleni dijelovi moraju biti od otpornog borsilikata, a preporučuje se upotreba opreme koja je namijenjena isključivo određivanju elemenata u tragovima.
- 4.3. Atomska apsorpcijski spektrofotometar spunjava zahtjeve metode s obzirom na osjetljivost i tačnosti u potrebnom području.

5. Postupak²

5.1. Uzorci koji sadrže organske materije

5.1.1. Spaljivanje i priprema rastvora za analizu³

5.1.1.1. Izmjeri se 5–10 g uzorka sa preciznošću od 0,2 mg i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine, osuši u sušnici na 105° C i postavi u hladnu mufolnu peč (tačka 4.1.). Peč se zatvori, a temperatura se tokom 90 minuta postupno podiže na 450–475° C. Ta temperatura se zadrži 4–16 sati (npr. tokom noći) kako bi se uklonile ugljenikove materije, a zatim se peč otvori i ohladi.

Pepeo se navlaži vodom i prenese u čašu zapremine 250 ml. Lončić se ispere sa ukupno približno 5 ml hlrovodonične kiseline (tačka 3.1.), a sadržaj se polako i oprezno prenese u čašu (može doći do burne reakcije zbog stvaranja CO₂). U kapljicama se dodaje hlrovodonična kiselina (tačka 3.1.), uz stalno miješanje dok ne prestane pjenušanje. Upari se do suva, uz povremeno miješanje staklenim štapićem.

Zatim se u ostatak doda 15 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i približno 120 ml vode. Promiješa se staklenim štapićem, koji se ostavi u čaši, a čaša se pokrije sahatnim staklom. Polako se zagrijava do ključanja i ostavi ključati do potpunog stvaranja pepela. Filtrira se kroz filter koji ne sadrži pepeo i prikupi u sud zapremine 250 ml. Čaša i filter se isperu sa 5 ml vruće hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i dva puta vrelom vodom. Sud se napuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

5.1.1.2. Ako ostatak na filtru izgleda crn (ugljenik), ponovo se stavi u peč i spali na 450–475° C. To je spaljivanje, za koje treba samo nekoliko sati (približno 3–5 sati), gotovo kada pepeo postane bijel ili gotovo bijel. Ostatak se rastvori sa približno 2 ml hlrovodonične kiseline (tačka 3.1.), upari se do suva i doda 5 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.). Zagrije se, rastvor se filtrira u sud i dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 mol/l).

Napomene:

(a) Pri određivanju elemenata u tragovima važno je biti na oprezu zbog opasnosti od kontaminacije, posebno cinkom, bakrom i gvožđem. Zbog toga oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ne smije sadržavati navedene metale.

Kako bi se smanjio opšti rizik od zagađenja treba raditi u atmosferi bez prašine sa potpuno čistom opremom i dobro opranim staklenim posuđem. Određivanje cinka posebno je osjetljivo na više vrsta kontaminacije, npr. staklenim posuđem, reagensima, prašinom itd.

(b) Masa uzorka koji se spaljuje izračunava se iz približnog sadržaja elementa u tragovima u hrani za životinje s obzirom na osjetljivost korišćenog spektrofotometra. Kod nekih vrsta hrane za životinje sa niskim sadržajem elemenata u tragovima trebaće možda započeti sa 10–20 g uzorka i konačni rastvor dopuniti do samo 100 ml.

(c) Spaljivanje se mora izvesti u zatvorenoj peći bez uduvavanja vazduha ili kiseonika.

(d) Temperatura na pirometru ne smije prijeći 475 °C.

5.1.2. Određivanje spektrofotometrijom

5.1.2.1. Priprema kalibracionog rastvora

Za svaki element koji se određuje pripremi se serija kalibracionih rastvora od standardnih radnih rastvora iz tač. 3.7.1., 3.8.1., 3.9.1. i 3.10.1. ovog dijela, pri čemu koncentracija HCl u svakom iznosi približno 0,5 mol/l i (u slučaju gvožđa, mangana i cinka) koncentraciju lantan hlrida koja odgovara 0,1% La (m/v)).

Odabrane koncentracije elemenata u tragovima moraju biti unutar područja osjetljivosti korišćenog spektrofotometra.

Sastavi tipičnih područja kalibracionih rastvora, zavisno od vrste i osjetljivosti korišćenog spektrofotometra dati su sljedećim tabelama.

Gvožđe							
µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.7.1.) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlrida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							
Bakar							
µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.8.1.) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (tačka 3.2.)	8	8	8	8	8	8	8
Mangan							
µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.9.1.) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlrida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							
Cink							
µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml radnog standardnog rastvora (tačka 3.9.1.) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (tačka 3.2.)	7	7	7	7	7	7	7
+10 ml rastvora lantan hlrida (tačka 3.11.) i dopuniti vodom do 100 ml							

² - Mogu se koristiti i druge metode za mineralizaciju ako dokazano garantuju uporedive rezultate (poput, mikrotalasne mineralizacije pod pritiskom).

³ - U zelenim hranivima (svježim ili osušenim) mogu se naći velike količine kvarca biljnog porijekla koji može sadržati elemente u tragovima koje treba ukloniti. Kod uzoraka takve hrane za životinje treba sprovesti sljedeći izmijenjeni postupak. Sprovodu se postupci iz tačke 5.1.1.1. sve do filtracije. Filter papir koji sadrži nerastvorljiv ostatak se dva puta ispere vrelom vodom i prenese u lončić za spaljivanje od kvarcnog stakla ili platine. Spali se u mufolnoj peći (tačka 4.1.) na temperaturi nižoj od 550° C do potpunog nestanka svih ugljenih materija. Ostavi se da se ohladi, doda se nekoliko kapi vode i 10–15 ml fluoridne kiseline (tačka 3.4.), zatim se upari do suva na otprilike 150° C. Ako se u ostatku i dalje nalazi kvarcni pijesak, ponovo se rastvori u nekoliko mililitara fluoridne kiseline (tačka 3.4.) i upari do suva. Doda se pet kapi sumporne kiseline (tačka 3.5.) i zagrijava dok ne prestane izlaziti bijeli dim. Nakon dodavanja 5 ml hlrovodonične kiseline 6 mol/l (tačka 3.2.) i oko 30 ml vode, zagrije se i rastvor filtrira u sud zapremine 250 ml te dopuni vodom do oznake (koncentracija HCl oko 0,5 mol/l). Nastavi se sa utvrđivanjem u skladu sa tačkom 5.1.2.

5.1.2.2. Priprema rastvora za analizu

Za određivanje bakra, rastvor pripremljen u skladu sa tačkom 5.1.1. obično se može koristiti direktno. Ako je koncentraciju potrebno prilagoditi tako da bude u području kalibracionih rastvora, pipetom se prenese alikvotni dio u graduisanu tikvicu zapremine 100 ml i dopuni do oznake hlorovodoničnom kiselinom 0,5 mol/l (tačka 3.3.).

Za određivanje gvožđa, mangana i cinka, pipetom se u sud zapremine 100 ml prenese alikvotni dio rastvora pripremljenog u skladu sa tačkom 5.1.1., doda 10 ml rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) i dopuni do oznake hlorovodičnom kiselinom 0,5 mol/l (tačka 3.3.).

5.1.2.3. Slijepa proba

Slijepa proba mora obuhvatati sve propisane korake postupka, osim što se izostavlja uzorak. Kao rastvor za slijepu probu ne smije se koristiti kalibraconi rastvor „0“.

5.1.2.4. Mjerenje atomske apsorpcije

Oksidacijskim plamenom vazduh-acetilen, izmjeri se atomska apsorpcija kalibracijskih rastvora i rastvora koju treba analizirati, na sljedećim talasnim dužinama:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Svako se mjerenje izvodi četiri puta.

5.2. Mineralna hrana za životinje

Ako uzorak ne sadrži organske materije, nije potrebno prethodno spaljivanje. Nastavlja se kako je opisano u tački 5.1.1.1. počevši od drugog stava. Može se izostaviti isparavanje u prisutnosti fluorovodonične kiseline.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija elementa u tragovima u rastvoru koja se analizira izračunava se iz kalibracione krive, a rezultat se iskazuje u miligramima elementa u tragovima na kilogram uzorka (ppm).

7. Ponovljivost

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

- 5 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima do 50 mg/kg,
- 10% višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima od 50–100 mg/kg,
- 10 mg/kg apsolutne vrijednosti za udio dotičnog elementa u tragovima od 100–200 mg/kg,
- 5% višeg rezultata za udio dotičnog elementa u tragovima iznad 200 mg/kg.

8. Napomena

Prisutnost velike količine fosfata može ometati postupak određivanja gvožđa, mangana i cinka. Takve se smetnje moraju korigirati dodavanjem rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.). Ako je, međutim, maseni odnos u uzorku ($\text{Ca} + \text{Mg/P} > 2$), može se izostaviti dodavanje rastvora lantan hlorida (tačka 3.11.) u rastvoru za analizu i u kalibracijskom rastvoru.

Dio IV ODREĐIVANJE HALOFUGINONA

DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa halofuginona u hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećom metodom. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. Princip

Nakon obrade vrućom vodom halofuginon se ekstrahuje u obliku slobodne baze u etil acetatu, zatim razdvoji kao hidrohlorid u vodenom rastvoru kiseline. Ekstrakt se prečišćava jonsko-izmjenjivačkom hromatografijom. Udio halofuginona određuje se tačnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) reverznih faza uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Acetonitril, za HPLC.

3.2. Smola Amberlite XAD-2.

3.3. Amonijum acetat.

3.4. Etil acetat.

3.5. Sirćetna kiselina, glacijalna

3.6. Standardna supstanca halofuginona (DL-trans-7-brom-6-hlor-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil) acetoni]-kinazolin-4-(3H)-on hidrobromid, E 764).

3.6.1. Osnovni rastvor standarda halofuginona, 100 µg/ml

Izmjeri se 50 mg halofuginona (tačka 3.6.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 500 ml, rastvori u puferskom rastvoru amonijum acetata (tačka 3.18.), dopuni puferskim rastvorom do oznake i promiješa. Taj je rastvor stabilan tri nedjelje na temperaturi od 5 °C ako se čuva na tamnom mjestu.

3.6.2. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 100 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.6.1.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (tačka 3.21.) i promiješa. U tim rastvorima koncentracija halofuginona iznosi 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml. Ovi se rastvori moraju pripremati svježi prije upotrebe.

3.7. Hlorovodična kiselina (p_{20} približno 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Srebro nitrat.

3.10. Natrijum askorbat.

3.11. Natrijum karbonat.

3.12. Natrijum hlorid.

3.13. EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina, dinatrijuma so).

3.14. Voda, za HPLC.

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

3.16. Rastvor natrijum karbonata zasićen natrijum hloridom, $c = 5 \text{ g/100 ml}$.

U vodi se rastvori 50 g natrijum karbonata (tačka 3.11.), razblaži do 1 litra, zatim se dodaje natrijum hlorid (tačka 3.12.) do zasićenja rastvora.

3.17. Hlorovodična kiselina, približno 0,1 mol/l.

Vodom se razblaži 10 ml HCl (tačka 3.7.) do 1 litra.

3.18. Puferski rastvor amonijum acetata, približno 0,25 mol/l.

U vodi (tačka 3.14) se rastvori 19,3 g amonijum acetata (tačka 3.3.) i 30 ml sirćetne kiseline (tačka 3.5.) i razblaži do 1 litra.

3.19. Priprema smole Amberlite XAD-2.

Vodom se ispere odgovarajuća količina Amberlita (tačka 3.2.) dok se ne uklone svi hloridni joni, što se pokazuje ogledom sa srebro nitratom (tačka 3.20.) u odbacenoj vodenoj fazi. Zatim se smola ispere s 50 ml metanola (tačka 3.8.), metanol se odbaci, a smola čuva u svježem metanolu.

3.20. Rastvor srebro nitrata, približno 0,1 mol/l.

Rastvori se 0,17 g srebro nitrata (tačka 3.9.) u 10 ml vode.

3.2.1. Mobilna faza HPLC-a.

Pomiješa se 500 ml acetonitrila (tačka 3.1.) s 300 ml puferskog rastvora amonijum acetata (tačka 3.18.) i 1 200 ml vode (tačka 3.14.). Sirćetnom kiselinom (tačka 3.5.) se vrijednost pH podesi na 4,3. Filtrira se kroz filter 0,22 µm (tačka 4.8.), i rastvor se degasifikuje (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu). Taj je rastvor stabilan mjesec dana ako se drži u zatvorenoj posudi u tamnom prostoru.

4. Oprema

4.1. Ultrazvučno kupatilo

4.2. Rotacioni vakuum uparivač

4.3. Centrifuga

4.4. HPLC s ultraljubičastim detektorom (UV) s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektorom s nizom dioda (DAD).

- 4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 300 mm × 4 mm, C₁₈, veličina čestica punjenja 10 μm iliekivalentna kolona
 4.5. Staklena kolona (300 mm × 10 mm) s filtrom od sinterovanog stakla i slavinom
 4.6. Filteri od staklenih vlakana, prečnika 150 mm
 4.7. Membranski filteri, 0,45 μm
 4.8. Membranski filteri, 0,22 μm

5. Postupak

Napomena: Halofuginon kao slobodna baza je nestabilan u alkalnim i etil-acetatnim rastvorima. Ne smije se ostaviti u etil acetatu duže od 30 minuta.

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nijesu prisutni niti halofuginon niti interferentne materije.

5.1.2. Test iskorišćenja (recovery) izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina halofuginona slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 3 mg/kg u 10 g slijepe probe hrane za životinje doda se 300 μl osnovnog rastvora standarda (tačka 3.6.1.), promiješa i pričekava 10 minuta prije početka postupka ekstrakcije (tačka 5.2.).

Napomena: Za sprovođenje ove metode, slijepe proba hrane za životinje treba biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost halofuginona.

5.2. Ekstrakcija

Izmjere se 10 g pripremljenog uzorka s preciznošću od 0,1 g i prenese u epruvetu za centrifugiranje zapremine 200 ml, doda se 0,5 g natrijum askorbata (tačka 3.10.), 0,5 g EDTA (tačka 3.13.) i 20 ml vode i promiješa. Epruveta se 5 minuta drži u vodenom kupatilu (80 °C). Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi doda se 20 ml rastvora natrijum karbonata (tačka 3.15.) i promiješa. Odmah se doda 100 ml etilacetata (tačka 3.4.) i 15 sekundi snažno protrese rukom. Zatim se epruveta 3 minuta drži u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) i otpusti slavinom. Centrifugira se 2 minuta, te se faza etilacetata dekantuje kroz filter od staklenih vlakana (tačka 4.6.) u lijevak za razdvajanje od 500 ml. Ponovi se ekstrakcija uzorka s dodatnih 100 ml etilacetata. Pomiješani ekstrakti se isperu 1 minut sa 50 ml rastvora natrijum karbonata zasićenim natrijum hloridom (tačka 3.16.), a vodeni se sloj odbaci.

Organski sloj se ekstrahuje 1 minut sa 50 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.17.). Donji kisjelinski sloj se prenese u lijevak za razdvajanje od 250 ml. Organski sloj se ponovo ekstrahuje 1,5 minut s dodatnih 50 ml hlorovodične kiseline i pomiješa s prvim ekstraktom. Pomiješani kisjelinski ekstrakti se približno 10 sekundi ispiraju protresivanjem s 10 ml etilacetata (tačka 3.4.).

Vodeni sloj se kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml, a organska faza se odbaci. Iz kiselog rastvora se u rotacionom uparivaču (tačka 4.2.) ispari sav preostali etilacetat. Temperatura vodenog kupatila ne smije preći 40 °C. Pod vakuumom na približno 25 milibara, odstrani se sav preostali etilacetat u 5 minuta na 38 °C.

5.3. Prečišćavanje ekstrakta

5.3.1. Priprema kolone s Amberlitom

Pripremi se kolona XAD-2 za svaki ekstrakt uzorka. Metanolom (tačka 3.8.) se prenese 10 g pripremljenog Amberlita (tačka 3.19.) u staklenu kolonu (tačka 4.5.). Na vrh punjenja smole postavi se tampon od staklene vune. Metanol se ispusti iz kolone, a smola ispere sa 100 ml vode tako da se dotok vode zaustavi kada tečnost dostigne vrh smole. Prije upotrebe kolona se ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežila. Kolona se nikad ne smije isušiti.

5.3.2. Prečišćavanje uzorka

Ekstrakt (tačka 5.2.) se kvantitativno prenese na vrh pripremljene kolone sa Amberlitom (tačka 5.3.1.) i eluira, a eluat se odbaci. Brzina eluiranja ne smije biti veća od 20 ml/min. Tikvica s okruglim dnom se ispere s 20 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.17.), a zatim se ista iskoristi za ispiranje kolone sa smolom. Kisjelina koja zaostane na koloni ukloni se prođuvavanjem vazduhom. Odbaci se tečnost od ispiranja. U kolonu se doda 100 ml metanola (tačka 3.8.), i 5 – 10 ml se eluira, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml. Preostali se metanol ostavi 10 minuta kako bi se uravnotežio sa smolom te se nastavi eluiranje brzinom koja ne prelazi 20 ml/min, a eluat se prikuplja u istoj tikvici s okruglim dnom. Metanol se uspari na rotacionom uparivaču (tačka 4.2.), pri čemu temperatura vodenog kupatila ne smije preći 40 °C. Ostatok se upotrebom mobilne faze (tačka 3.21.) kvantitativno prenese u građuisanu tikvicu zapremine 10 ml. Dopuni se mobilnom fazom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (tačka 4.7.). Taj se rastvor čuva za određivanje HPLC-om (tačka 5.4.).

5.4. Određivanje na HPLC-u

5.4.1. Parametri

Sledeći se uslovi predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.4.1.)

Mobilna faza HPLC-a (tačka 3.21.)

Brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min

Talasna dužina detekcije: 243 nm

Zapremina za ubrizgavanje: 40 do 100 μl

Provjeri se stabilnost hromatografskog sistema injektiranjem kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2) koncentracije 3,0 μg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna retencionna vremena.

5.4.2. Kalibraciona kriva

Svaki se kalibracioni rastvor (tačka 3.6.2.) injektira više puta i za svaku se koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u μg/ml.

5.4.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednake zapremine kao za kalibracioni rastvor, a zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova halofuginona.

6. Preračun rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u μg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pika halofuginona u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.4.2.).

Sadržaj halofuginona (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times 10/m$$

pri čemu je:

c= koncentracija halofuginona u rastvoru uzorka u μg/ml,

m=količina ispitivanog uzorka u gramima

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili upotrebom detektora s nizom dioda (DAD) kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2.) koncentracije 6,0 μg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka doda se određena količina kalibracionog rastvora (tačka 3.6.2.). Količina dodanog halofuginona mora biti slična procijenjenoj količini halofuginona u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika halofuginona uzimajući u obzir dodatke količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini maksimalne visine mora biti unutar ±10% početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora sa nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;

(b) između 225 i 300 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita;

(c) između 225 i 300 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha pika i krive pada pika dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne treba da se međusobno razlikuju za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije preći 0,5 mg/kg za udio halofuginona do 3 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje⁴ u kojem je osam laboratorija analiziralo tri uzorka:

Rezultati					
	Uzorak A (slijepi) kod prijema	Uzorak B (brašno)		Uzorak C (pelete)	
		Kod prijema	Nakon 2 mjeseca	Kod prijema	Nakon 2 mjeseca
Srednja vrijednost [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND= nije detektovano

SR=standardna devijacija obnovljivosti

CVR=koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Rec=iskorišćenje

Dio V ODREĐIVANJE ROBENIDINA

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

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa robenidina u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje zakisjeljenim metanolom. Ekstrakt se osuši i alikvotni dio prečisti na koloni aluminijum oksida. Robenidin se eluira metanolom iz kolone, koncentruje i dopuni mobilnom fazom do odgovarajuće zapremine. Udio robenidina se određuje tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznim fazama uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol.

3.2. Zakisjeljeni metanol.

U sud zapremine 500 ml prenese se 4,0 ml hlorovodične kiseline ($p_{20} = 1,18$ g/ml), dopuni metanolom (tačka 3.1.) do oznake i promiješa. Taj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.3. Acetonitril, za HPLC.

3.4. Molekulska sito.

Tip 3A, otvori mreže od 8 do 12 (otvori promjera 1,6 – 2,5 mm, kristalni aluminijum silikat, promjer pora 0,3 mm).

3.5. Aluminijum oksid kiseline aktivnosti I. stepena, za kolonsku hromatografiju.

U odgovarajuću posudu prenese 100 g aluminijum oksida i doda 2,0 ml vode. Začepi se i promućka približno 20 minuta. Drži se u čvrsto zatvorenoj posudi.

3.6. Rastvor kalijum dihidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.

U vodi se rastvori 3,40 g kalijum dihidrogenfosfata (za HPLC) u sudu zapremine 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.7. Rastvor dinatrijum hidrogenfosfata, $c = 0,025$ mol/l.

U vodi se rastvori 3,55 g bezvodnog dinatrijum hidrogenfosfata (ili 4,45 g dihidrata ili 8,95 g dodekahidrata) (za HPLC) u sudu zapremine 1 000 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.8. Mobilna faza HPLC-a.

Pomiješaju se sljedeći reagensi:

650 ml acetonitrila (tačka 3.3.),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml rastvora kalijum dihidrogenfosfata (tačka 3.6.),

50 ml rastvora dinatrijum hidrogenfosfata (tačka 3.7.).

Filtrira se kroz filter 0,22 μ m (tačka 4.6.), rastvor se zatim degasifikuje (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu).

3.9. Standardna supstanca.

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

3.9.1. Osnovni rastvor standarda robenidina: 300 μ g/ml.

Izmjeri se 30 mg standarda robenidina (tačka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg. Rastvori se u zakisjeljenom metanolu (tačka 3.2.) u sudu zapremine 100 ml, dopuni istim rastvorom do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijumskom folijom i čuva na tamnom mjestu.

3.9.2. Intermedijarni rastvor standarda robenidina: 12 μ g/ml

U sudu zapremine 250 ml prenese se 10,0 ml osnovnog rastvora standarda robenidina (tačka 3.9.1.), dopuni mobilnom fazom (tačka 3.8.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijumskom folijom i čuva na tamnom mjestu.

3.9.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.9.2.). Dopuni se mobilnom fazom (tačka 3.8.) do oznake i promiješa. Ti rastvori odgovaraju koncentracijama robenidina od 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 i 6,0 μ g/ml. Ti se rastvori moraju pripremiti svježi prije upotrebe.

3.10. Voda za HPLC.

4. Oprema

4.1. Staklena kolona.

Od tamnog stakla, s slavinom i rezervoarom zapremine približno 150 ml, unutašnjeg prečnika 10 – 15 mm, dužine 250 mm

4.2. Mehanički šejker ili magnetna mješalica.

4.3. Rotacioni vakuum uparivač.

4.4. Oprema za HPLC s ultraljubičastim detektorom (UV) s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektorom s nizom dioda (DAD) s radnim područjem od 250 – 400 nm.

4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju: 300 mm $\times$ 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 μ m ili ekvivalentna.

4.5. Filter papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentni).

4.6. Membranski filteri, 0,22 μ m.

4.7. Membranski filteri, 0,45 μ m.

5. Postupak

Napomena: Robenidin je osjetljiv na svjetlo. U svim se postupcima mora koristiti posuđe od tamnog stakla.

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan niti robenidin niti interferentne materije.

⁴ - The Analyst 108, 1983., str. 1 252. - 1 256.

5.1.2. Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepe probe hrane za životinje (tačka 5.1.1.) kojoj se doda količina robenidina slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 60 mg/kg prenese se 3,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.9.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml. Rastvor se upari u struji azota do približno 0,5 ml. Dodaje se 15 g slijepe probe hrane za životinje, promiješa, ostavi 10 minuta i nastavi s ekstrakcijom (tačka 5.2.).

Napomena: Pri sprovođenju ove metode slijepe proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost robenidina.

5.2. Ekstrakcija

Izmjeri se približno 15 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 250 ml, doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.2.), začepi i mučka jedan sat na šejkeru (tačka 4.2.). Rastvor se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (tačka 4.5.) u konusnu tikvicu zapremine 150 ml. Dodaje se 7,5 g molekulskog sita (tačka 3.4.), začepi i mučka pet minuta. Odmah se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana. Ovaj se rastvor čuva za fazu prečišćavanja (tačka 5.3.).

5.3. Prečišćavanje

5.3.1. Priprema kolone s aluminijum oksidom

U donji dio staklene kolone (tačka 4.1.) postavi se mali čep od staklene vune i nabije staklenim štapićem. Izmjeri se 11,0 g pripremljenog aluminijum oksida (tačka 3.5.) i prenese u kolonu. Pri tom treba paziti da izloženost vazduhu tokom navedenog postupka bude što je moguće manja. Laganim udarcima po donjem dijelu napunjene kolone istaloži se aluminijum oksid.

5.3.2. Prečišćavanje uzorka

U kolonu se pipetom prenese 5,0 ml ekstrakta uzorka pripremljenog u (tačka 5.2.). Vrh pipete se nasloni na zid kolone, zatim se pusti da aluminijum oksid apsorbira rastvor. Robenidin se eluira iz kolone sa 100 ml metanola (tačka 3.1.) uz brzinu protoka od 2 – 3 ml/min, a eluat se prikupi u tikvicu s okruglim dnom zapremine 250 ml. Rastvor metanola se upari u rotacionom uparivaču (tačka 4.3.) do suva pri sniženom pritisku, na 40 °C. Ostatak se ponovo rastvori u 3 – 4 ml mobilne faze (tačka 3.8.) i prenese u sud zapremine 10 ml. Tikvica se nekoliko puta ispere s 1 – 2 ml mobilne faze, a isprana tečnost prenese u sud. Dopuni se istim rastvorom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.7.). Ovaj se rastvor čuva za određivanje na HPLC-u (tačka 5.4.).

5.4. Određivanje na HPLC-u

5.4.1 Parametri

Sljedeći uslovi se predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati:

kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.4.1.),

Mobilna faza HPLC (tačka 3.8.),

brzina protoka: 1,5 – 2 ml/min,

talasna dužina detekcije: 317 nm,

injektovana zapremina: 20 – 50 µl.

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektovanjem kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.) koncentracije 3,6 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retencionna vremena

5.4.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.9.3.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.3.2.), pri čemu se koriste jednake zapremine kao za kalibracione rastvore, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova robenidina.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednje vrijednosti visina (površina) pikova robenidina u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.4.2.).

Sadržaj robenidina (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times 200/m$$

pri čemu je:

c= koncentracija robenidina u rastvoru uzorka u µg/ml,

m= masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.) koncentracije 6 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka dodaje se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.9.3.). Količina dodatog robenidina mora biti slična procijenjenoj količini robenidina u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika robenidina uzimajući u obzir dodatke količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini maksimalne visine mora biti unutar približno 10 % početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda (DAD)

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar približno 2 nm;

(b) između 250 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100% relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15% apsorpcije standardnog analita;

(c) između 250 i 400 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15% apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije preći 10 % vrijednosti višeg rezultata za udio robenidina viši od 15 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje treba da iznosi najmanje 85 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijska ispitivanja u kojoj se u 12 laboratorija analiziralo četiri uzorka hrane za živinu i kuniće u obliku brašna i peleta, a svaki se uzorak analizirao dvaput i rezultati analize dati su u sljedećoj tabeli:

	Hrana za živinu		Hrana za kuniće	
	Brašno	Pelet	Brašno	Pelet
Srednja vrijednost [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Iskorišćenje [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

Sr=standardna devijacija ponovljivosti
CVr=koeficijent varijacije ponovljivosti (%)
SR=standardna devijacija obnovljivosti
CVR=koeficijent varijacije obnovljivosti (%)

Dio VI ODREĐIVANJE DIKLAZURILA

(+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitril

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa diklazurila u hrani za životinje i premiksima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije iznosi 0,1 mg/kg, a granica kvantifikacije 0,5 mg/kg.

2. Princip

Nakon dodavanja internog standarda, uzorak se ekstrahuje zakisjelijem metanolom. Kod hrane za životinje alikvot ekstrakta se prečišćava na koloni sa SPE C₁₈ punjenjem. Diklazuril se eluira sa sa kolone smješom zakisjelijem metanola i vode. Nakon uparavanja, ostatak se rastvori u smješi DMF/voda. Kod premiksa, ekstrakt se upari, a ostatak rastvori u smješi DMF/voda. Udio diklazurila određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom i ternarnim gradijentom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Voda, za HPLC.

3.2. Amonijum acetat.

3.3. Tetrabutilamonijum hidrogen sulfat (TBHS).

3.4. Acetonitril, za HPLC.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. N,N-dimetilformamid (DMF).

3.7. Hlorovodična kisjeline, $p_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8. Standardna supstanca: Diklazuril II-24: (+)-4-hlorfenil [2,6-dihlor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetonitril, garantovane čistoće, E771.

3.8.1. Osnovni rastvor standarda diklazurila, 500 µg/ml.

Izmjeri se 25 mg standardne materije diklazurila (tačka 3.8.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 50 ml. Rastvori se u DMF-u (tačka 3.6.), sud se dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Pri temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.8.2. Rastvor standarda diklazurila, 50 µg/ml.

U sud zapremine 50 ml prenese se 5,00 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.8.1.), dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9. Interni standard: 2,6-dihlor-4-(4-hlorfenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-dioksa-1,2,4-triazin-2 (3H)-il) α -metilbenzen-acetonitril.

3.9.1. Osnovni rastvor internog standarda, 500 µg/ml.

Izmjeri se 25 mg internog standarda (tačka 3.9.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 50 ml. Rastvori se u DMF-u (tačka 3.6.), sud se dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9.2. Rastvor internog standarda, 50 µg/ml.

U sud zapremine 50 ml prenese se 5,00 ml osnovnog rastvora internog standarda (tačka 3.9.1.), dopuni DMF-om (tačka 3.6.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.9.3. Rastvor internog standarda za premikse, p/1 000 mg/ml.

(p = nominalni udio diklazurila u premiks, u mg/kg)

Izmjeri se p/10 mg internog standarda s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml, rastvori u DMF-u (tačka 3.6.) u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.6.), dopuni DMF-om do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.10. Kalibracioni rastvor, 2 µg/ml.

Pipetom se prenese 2,00 ml rastvora standarda diklazurila (tačka 3.8.2.) i 2,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) u sud zapremine 50 ml. Doda se 16 ml DMF (tačka 3.6.), sud se dopuni vodom do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.11. Kolona C₁₈ za ekstrakciju na čvrstoj fazi, npr. Bond Elut, veličina: 1 cc, masa apsorbenta: 100 mg.

3.12. Ekstrakcioni rastvarač: zakisjelijeni metanol.

Pipetom se prenese 5,0 ml hlorovodične kisjeline (točka 3.7.) u 1 000 ml metanola (tačka 3.5.) i promiješa.

3.13. Mobilna faza za HPLC.

3.13.1. Eluent A: rastvor amonijum acetata i tetrabutilamonijum hidrogen sulfata.

Rastvori se 5 g amonijum acetata (tačka 3.2.) i 3,4 g TBHS-a (tačka 3.3.) u 1 000 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa.

3.13.2. Eluent B: acetonitril (tačka 3.4.).

3.13.3. Eluent C: metanol (tačka 3.5.).

4. Oprema

4.1. Mehanički šejker

4.2. Oprema za HPLC s ternarnim gradijentom

4.2.1. Kolona za tečnu hromatografiju, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm, 100 mm × 4,6 mm ili ekvivalentna

4.2.2. UV detektor s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektor s nizom dioda (DAD).

4.3. Rotacioni vakuum uparivač

4.4. Membranski filter, 0,45 µm

4.5. Vakuumski "manifold"

4.6. Ultrazvučno kupatilo

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Analizom slijepa probe hrane za životinje treba potvrditi da nije prisutan ni diklazuril ni druge interferentne materije. Slijepa proba hrane za životinje treba da bude slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost diklazurila ili interferentnih materija.

5.1.2. Test iskorišćenja (Recovery test)

Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepa probe hrane za životinje kojoj se doda količina diklazurila slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije od 1 mg/kg doda se 0,1 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.8.1.) u 50 g slijepa probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta, a prije nastavka (tačka 5.2.) miješanje se više puta ponovi.

Ako nije dostupna slijepa probe hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku za analizu dodaje količina diklazurila slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodatog diklazurila, a iskorišćenje se izračunava oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Hrana za životinje

Izmjeri se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 500 ml, doda 1,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.2.) i 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smješa se tokom noći mučka na mješalici (tačka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U odgovarajuću staklenu posudu prenese se alikvot 20 ml supernatanta i razblaži sa 20 ml vode. Taj se rastvor prenese na SPE kolonu (tačka 3.11.) i filtrira pod vakuumom (tačka 4.5.). Kolona se ispere s 25 ml smješe ekstrakcionog rastvora (tačka 3.12.) i vode, 65 + 35 (V + V). Prikupljene se frakcije odbace, a komponente se eluiraju s 25 ml smješe ekstrakcionog rastvora (tačka 3.12.) i vode, 80 + 20 (V + V). Ova se frakcija uparava u

rotacionom uparivaču (tačka 4.3) pri 60 °C skoro do suva. Ostatak se rastvori u 1,0 ml DMF-a (tačka 3.6), doda se 1,5 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa. Filtrira se kroz membranski filter (tačka 4.4.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Izmjeri se približno 1 g uzorka s preciznošću od 0,001 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 500 ml, doda se 1,00 ml rastvora internog standarda (tačka 3.9.3.) i 200 ml ekstrakcionog rastvarača (tačka 3.12.), zatim se tikvica zatvori. Smješa se tokom noći mučka na mješalici (tačka 4.1.). Ostavi se 10 minuta da se istaloži. U odgovarajuću veliku staklenu tikvicu s okruglim dnom prenese se alikvot (10 000/p ml, p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksi) supernatanta. Upari se pod sniženim pritiskom na 60 °C u rotacionom uparivaču (tačka 4.3.) skoro do suva. Ostatak se rastvori u 10,0 ml DMF-a (tačka 3.6.), doda se 15,0 ml vode (tačka 3.1.) i promiješa. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. Određivanje na HPLC-u

5.3.1. Parametri

Za određivanje HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tačnu hromatografiju (tačka 4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, veličina čestica punjenja 3 µm ili ekvivalentna	
Mobilna faza:	Eluent A (tačka 3.13.1.):	vodeni rastvor amonijum acetata i tetrabutil amonijum hidrogen sulfata
	Eluent B (tačka 3.13.2.):	acetonitril
	Eluent C (tačka 3.13.3.):	metanol
Način eluiranja:	— linearni gradijent — početni uslovi: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — nakon 10 minuta, eluiranje sa gradijentom tokom 30 minuta do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Ispiranje 10 minuta sa B.	
Brzina protoka:	1,5 – 2 ml/min	
Zapremina injektiranja:	20 µl	
Talasna dužina detekcije:	280 nm	

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektiranjem kalibracionog rastvora koncentracije 2,0 µg/ml (tačka 3.10.) sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retenciona vremena

5.3.2. Kalibracioni rastvor

Više puta se injektira kalibracioni rastvor (tačka 3.10.) i odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova diklazurila i internog standarda.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira 20 µl kalibracionog rastvora (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) i odredi srednja vrijednost visine (površine) pikova diklazurila i internog standarda.

6. Izračunavanje rezultata

6.1. Hrana za životinje

Sadržaj diklazurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$W = (h_{d,s} \times h_{i,c} / h_{i,s} \times h_{d,c}) \times (C_{d,c} \times 10 V) / m \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

- $h_{d,s}$ = visina (površina) pika diklazurila u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.)
- $h_{i,s}$ = visina (površina) pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.)
- $h_{d,c}$ = visina (površina) pika diklazurila u kalibracionom rastvoru (tačka 3.10.)
- $h_{i,c}$ = visina (površina) pika internog standarda u kalibracionom rastvoru (tačka 3.10.)
- $C_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracionom rastvoru u µg/ml (tačka 3.10.)
- m = masa ispitivanog uzorka u gramima
- V = zapremina ekstrakta uzorka u skladu s tačkom 5.2.1 (tj. 2,5 ml).

6.2. Premiksi

Sadržaj diklazurila (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$W = (h_{d,s} \times h_{i,c} / h_{i,s} \times h_{d,c}) \times (C_{d,c} \times 0,02V \times p) / m \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

- $h_{d,c}$ = visina (površina) pika diklazurila u kalibracionom rastvoru (tačka 3.10.)
- $h_{i,c}$ = visina (površina) pika internog standarda u kalibracionom rastvoru (tačka 3.10.)
- $h_{d,s}$ = visina (površina) pika diklazurila u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.)
- $h_{i,s}$ = visina (površina) pika internog standarda u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.)
- $C_{d,c}$ = koncentracija diklazurila u kalibracionom rastvoru u µg/ml (tačka 3.10.)
- m = masa ispitivanog uzorka u gramima
- V = zapremina ekstrakta uzorka u skladu s tačkom 5.2.2 (tj. 25 ml)
- p = nominalni udio diklazurila u mg/kg u premiksi.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda (DAD) kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.10.).

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.10.). Količina dodanog diklazurila mora biti slična količini diklazurila određenoj u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika diklazurila i internog standarda uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini visine mora biti unutar ± 10 % početne širine pika diklazurila ili pika internog standarda ekstrakta uzorka bez dodatka.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda (DAD)

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

- (a) Talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.
- (b) Između 230 i 320 nm, spektri krive rasta, najviše tačke pika i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100% relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.
- (c) Između 230 i 320 nm, spektri krive rasta, najviše tačke pika i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10–100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 30 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila između 0,5–2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg za udio diklazurila između 2,5 – 5 mg/kg,
- 15 % relativne vrijednosti u odnosu na najvišu vrijednost za udio diklazurila veći od 5 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80%.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje u kojem 11 laboratorija analiziralo pet uzoraka. Ti su se uzorci sastojali od dva premiksa; jedan je bio pomiješan s organskom matriksom (O 100), a drugi s neorganskim matriksom (A 100). Teoretski sadržaj iznosi 100 mg diklaurila na kg. Tri različita proizvođača (NL) (L1/Z1/K1) proizvela su 3 mješavine hrane za živinu. Teoretski sadržaj iznosi 1 mg diklaurila na kg. Od laboratorija je zatraženo da svaki uzorak analiziraju jedanput ili dvaput. (Detaljnije informacije o navedenoj međulaboratorijskom ispitivanju mogu se pronaći u *Journal of AOAC International*, dio 77, br. 6, 1994., str. 1 359. – 1 361.). Rezultati laboratorijskih analiza dati su u sljedećoj tabeli:

	Uzorak 1 A 100	Uzorak 2 O 100	Uzorak 3 L1	Uzorak 4 Z1	Uzorak 5 K1
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 = koeficijent varijacije ponovljivosti
S_R = standardna devijacija obnovljivosti
CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti.

9. Napomena

Prethodno treba dokazati da je odziv diklaurila linearan u području koncentracija koje se mjere.

Dio VII

ODREĐIVANJE LASALOCID NATRIJUMA

Natrijumova so polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi Streptomyces lasaliensis

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa lasalocid natrijuma u hrani za životinje i premiksima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije iznosi 5 mg/kg, a granica kvantifikacije 10 mg/kg.

2. Princip

Lasalocid natrijum se ekstrahuje iz uzorka u zakiseljeni metanol i određuje tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu spektrofotometrijskog detektora.

3. Reagensi

3.1. Kalijum dihidrogen fosfat (KH₂PO₄).

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

3.3. Rastvor ortofosforne kiseline, c = 20 %.

23,5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.2.) razblaži se vodom do 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin), m (m/m) = 99 %.

3.5. Metanol, za HPLC.

3.6. Hlorovodična kiselina, gustina = 1,19 g/ml.

3.7. Rastvor fosfatnog pufera, c = 0,01 mol/l.

Rastvori se 1,36 g KH₂PO₄ (tačka 3.1.) u 500 ml vode (tačka 3.11.), doda se 3,5 ml ortofosforne kiseline (tačka 3.2.) i 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (tačka 3.4.). Rastvor ortofosforne kiseline (tačka 3.3.) pH vrijednost se podesi na 4,0 i razrijedi vodom (tačka 3.11.) do 1 000 ml.

3.8. Zakiseljeni metanol.

U sud zapremine 1 000 ml prenese se 5,0 ml hlorovodične kiseline (tačka 3.6.), dopuni metanolom (tačka 3.5.) do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.9. Mobilna faza HPLC-a, rastvor fosfatnog pufera i metanola 5 + 95 (V + V).

Pomiješa se 5 ml rastvora fosfatnog pufera (tačka 3.7.) sa 95 ml metanola (tačka 3.5.).

3.10. Lasalocid natrijum standardna supstanca garantovane čistoće, C₃₄H₅₃O₈Na (natrijumova so polietar monokarboksilne kiseline koju proizvodi *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Osnovni rastvor standarda lasalocid natrijuma, 500 µg/ml

Izmjeri se 50 mg lasalocid natrijuma (tačka 3.10.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml, rastvori u zakiseljenom metanolu (tačka 3.8.) i istim rastvorom dopuni do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.2. Intermedijarni rastvor standarda lasalocid natrijuma, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 10,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.10.1.) u sud zapremine 100 ml i zakiseljenim metanolom (tačka 3.8.) dopuni do oznake i promiješa. Ovaj se rastvor mora pripremiti svjež prije upotrebe.

3.10.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.10.2.). Zakiseljenim se metanolom dopuni do oznake (tačka 3.8.) i promiješa. Ovi rastvori odgovaraju 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 µg lasalocid natrijuma na ml. Ovi se rastvori moraju pripremiti svježi prije upotrebe.

3.11. Voda, za HPLC

4. Oprema

4.1. Ultrazvučno kupatilo (ili vodeno kupatilo sa mućkanjem) sa kontrolom temperature

4.2. Membranski filteri, 0,45 µm

4.3. Oprema za tečnu hromatografiju visoke efikasnosti (HPLC) sa injektionim sistemom odgovarajućim za injektovanje zapremina od 20 µl

4.3.1. Kolona za tečnu hromatografiju 125 mm × 4 mm, reverzna faza C₁₈, veličina čestica punjenja 5 µm ili ekvivalentna

4.3.2. Spektrofotometar s mogućnošću promjene talasne dužine (ekscitacije i emisije)

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Za sprovođenja testa iskorišćenja (tačka 5.1.2.) analizira se slijepa proba hrane za životinje kako bi se potvrdilo da nisu prisutni ni lasalocid natrijum, ni interferentne materije. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost lasalocid natrijuma i interferentnih materija.

5.1.2. Test iskorišćenja (Recovery test)

Test iskorišćenja izvodi se analizom slijepa probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine lasalocid natrijuma slične količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije 100 mg/kg prenese se 10,0 ml osnovnog standardnog rastvora (tačka 3.10.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml i rastvor upari do približno 0,50 ml. Doda se 50 g slijepa probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta, a prije ekstrakcije, miješanje se više puta ponovi (tačka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa probe hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku za analizu doda količina lasalocid natrijuma slična onoj koja se već nalazi u uzorku. Ovaj se uzorak analizira zajedno sa uzorkom bez dodatog lasalocid natrijuma, a iskorišćenje se izračuna oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Hrana za životinje

Izmjeri se 5–10 g uzorka s preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 250 ml s čepom. Pipetom se doda 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.8.). Poklopac se lagano zatvori i tikvica promućka radi disperzije uzorka. Tikvica se drži 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupatila i ohladi na sobnoj temperaturi. Ostavi se približno 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.2.) u prikladnu posudu. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi

Izmjeri se približno 2 g neusitnjenog premiksa s preciznošću od 0,001 g i prenese u sud zapremine 250 ml. Dodaje se 100,0 ml zakiseljenog metanola (tačka 3.8.), tikvica se protrese radi disperzije uzorka. Sud sa sadržajem drži se 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.) na približno 40 °C, zatim se izvadi iz kupatila i ohladi na sobnoj temperaturi. Zakiseljenim metanolom se (tačka 3.8.) razblaži do oznake i dobro promiješa. Ostavi se 1 sat dok se suspenzija ne istaloži, zatim se alikvotni dio filtrira kroz membranski filter 0,45 µm (tačka 4.2.). Odgovarajuća zapremina čistog filtrata razblaži se zakiseljenim metanolom (tačka 3.8.), čime se dobija konačni test rastvor koncentracije približno 4 µg/ml lasalocid natrijuma. Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. Određivanje na HPLC-u

5.3.1. Parametri

Za određivanje HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati:

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.3.1.):	125 mm × 4 mm, povratna faza C ₁₈ , veličina čestica punjenja 5 µm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.9.):	Smjesa rastvora fosfatnog pufera (tačka 3.7.) i metanola (tačka 3.5.), 5 + 95 (V + V)
Brzina protoka:	1,2 ml/min
Talasna dužina detekcije:	
Ekscitacija:	310 nm
Emisija:	419 nm
Zapremina za injektiranje:	20 µl

Stabilnost hromatografskog sistema provjerava se injektiranjem kalibracionog rastvora koncentracije 4,0 µg/ml (tačka 3.10.3.) sve dok se ne postignu konstantne visine (ili površine) pikova i konstantna retenciona vremena.

5.3.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.10.3.) i za svaku koncentraciju izmjere se srednje vrijednosti visina (površina) pika. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektiraju ekstrakti uzorka dobijeni u tački 5.2.1. ili 5.2.2. ovog dijela, pri čemu se koristi jednaka zapremina kao za kalibracioni rastvor i odrede srednje vrijednosti visina (površina) pikova lasalocid natrijuma.

6. Izračunavanje rezultata

Iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova dobijenih injektiranjem rastvora uzorka (tačka 5.3.3.) određuje se koncentracija lasalocid natrijuma (µg/ml) iz kalibracione krive.

6.1. Hrana za životinje

Udio lasalocid natrijuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times V_1 / m \quad \text{mg/kg}$$

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrijuma u rastvoru uzorka (tačka 5.2.1.) u µg/ml

V₁ = zapremina ekstrakta uzorka u skladu sa tačkom 5.2.1. u ml (tj. 100)

m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi

Udio lasalocid natrijuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = c \times V_2 \times f / m \quad \text{mg/kg}$$

pri čemu je:

c = koncentracija lasalocid natrijuma u rastvoru uzorka (tačka 5.2.2.) u µg/ml

V₂ = zapremina ekstrakta uzorka u skladu sa tačkom 5.2.2. u ml (tj. 250)

f = faktor razblaženja u skladu s 5.2.2.

m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Metode koje se temelje na spektrofotometriji manje su podložne interferencama od metoda kod kojih se koristi UV detekcija. Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom.

7.1.1. Ko-hromatografija

Ekstraktu uzorka (tačka 5.2.1. ili 5.2.2.) dodaje se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.10.3.). Količina dodatog lasalocid natrijuma mora biti slična količini lasalocid natrijuma u ekstraktu uzorka. Smije se povećati samo visina pika lasalocid natrijuma uzimajući u obzir količine dodatog lasalocid natrijuma i razblaženje ekstrakta. Širina pika, na polovini visine, mora biti unutar ± 10 % početne vrijednosti širine pika dobijene iz ekstrakta uzorka bez dodatog lasalocid natrijuma.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15 % više vrijednosti za udio lasalocid natrijuma od 30 – 100 mg/kg,
- 15 mg/kg za udio lasalocid natrijuma od 100 – 200 mg/kg,
- 7,5 % više vrijednosti za udio lasalocid natrijuma veći od 200 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni (slijepi) uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 80%. Za obogaćene uzorke premiksa iskorišćenje mora iznositi najmanje 90%.

8. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje⁵ u kojem je 12 laboratorija analiziralo 2 premiksa (uzorci 1 i 2) i 5 uzoraka hrane za životinje (uzorci 3 – 7). Svaki se uzorak analizirao dva puta. Rezultati su prikazani u donjoj tabeli:

⁵ - Analyst, 1995., 120, 2 175. - 2 180.

	Uzorak 1 Premiks za piliće	Uzorak 2 Premiks za ćurke	Uzorak 3 Granulat za ćurke	Uzorak 4 Mrvice za piliće	Uzorak 5 Hrana za ćurke	Uzorak 6 Hrana za živinu A	Uzorak 7 Hrana za živinu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrijednost [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Nominalni udio [mg/kg]	5 000 ⁽¹⁾	16 000 ⁽¹⁾	80 ⁽¹⁾	105 ⁽¹⁾	120 ⁽¹⁾	50 ⁽²⁾	35 ⁽²⁾
⁽¹⁾ Udio koji je naveo proizvođač.							
⁽²⁾ Hrana za životinje pripremljena u laboratoriji.							
L	=	broj laboratorija;					
n	=	broj pojedinačnih vrijednosti					
s_r	=	standardna devijacija ponovljivosti					
s_R	=	standardna devijacija obnovljivosti					
CV_r	=	koeficijent varijacije ponovljivosti u %					
CV_R	=	koeficijent varijacije obnovljivosti u %.					

METODE ZA KONTROLU NEPOŽELJNIH SUPSTANCI U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Dio I
ODREĐIVANJE SLOBODNOG I UKUPNOG GOSIPOLA

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa slobodnog i ukupnog gosipola te hemijski srodnih materija u sjemenu pamuka, brašnu od pamukovog sjemena i pogači od pamukovog sjemena te u smješama za ishranu životinja koje sadrže određene sirovine za hranu za životinje, kada je koncentracija slobodnog i ukupnog gosipola te hemijski srodnih materija veća od 20 mg/kg vrši se prema sljedećoj metodi.

2. Princip

Gosipol se ekstrahuje u prisutnosti 3-aminopropan-1-ola, bilo smješom propan-2-ola i heksana kod određivanja slobodnog gosipola, bilo dimetilformamidom kod određivanja ukupnog gosipola. Gosipol se anilinom pretvori u gosipol-dianilin, čija se optička gustina mjeri na 440 nm.

3. Reagensi

3.1. Smješa propan-2-ol-heksana: pomiješa se 60 zapreminskih dijelova propan-2-ola s 40 zapreminskih dijelova n-heksana.

3.2. Rastvarač A: U sud zapremine 1 l doda se približno 500 ml smješe propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.), 2 ml 3-aminopropan-1-ola, 8 ml glacialne sirćetne kiseline i 50 ml vode. Dopuni se do oznake smješom propan-2-ola i heksana (tačka 3.1.). Ovaj je reagens stabilan nedjelju dana.

3.3. Rastvarač B: U sud zapremine 100 ml pipetom se prenese 2 ml 3-aminopropan-1-ola i 10 ml glacialne sirćetne kiseline. Ohladi se na sobnu temperaturu i dopuni do oznake N,N-dimetilformamidom. Ovaj je reagens stabilan nedjelju dana.

3.4. Anilin: Ako optička gustina u testu sa slijepom probom prelazi 0,022, anilin se destiluje iznad cinka u prahu, pri čemu se odbaci prva i zadnja frakcija od 10 % destilata. Ako se reagens drži u frižideru u zatvorenoj posudi od tamnog stakla, može se održati nekoliko mjeseci.

3.5. Standardni rastvor gosipola A: U sud zapremine 250 ml doda se 27,9 mg gosipol acetata. Rastvori se i dopuni rastvaračem A (tačka 3.2.) do oznake. Pipetom se prenese 50 ml ovog rastvora u sud zapremine 250 ml i dopuni rastvaračem A do oznake. Koncentracija gosipola u tom rastvoru iznosi 0,02 mg/ml. Prije upotrebe rastvor se ostavi jedan sat na sobnoj temperaturi.

3.6. Standardni rastvor gosipola B: U sud zapremine 50 ml doda se 27,9 mg gosipol acetata. Rastvori se i dopuni rastvaračem B (tačka 3.3.) do oznake. Koncentracija gosipola u tom rastvoru iznosi 0,5 mg/ml.

Ako se zaštite od svjetla, standardni rastvora gosipola A i B stabilni su 24 sata.

4. Oprema

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

4.2. Spektrofotometar

5. Postupak

5.1. Ispitivani uzorak

Količina korišćenog ispitivanog uzorka zavisi o očekivanom sadržaju gosipola u uzorku. Poželjno je koristiti malu količinu ispitivanog uzorak i relativno velik alikvot filtrata tako da se dobije dovoljna količina gosipola za tačna fotometrijska mjerenja. Kod određivanja slobodnog gosipola u sjemenu pamuka, brašnu od pamukovog sjemena i pogači od pamukovog sjemena, količina ispitivanog uzorka ne prelazi 1 g; za smješom za ishranu životinja količina može biti do 5 g. U većini primjera je odgovarajući alikvot filtrata od 10 ml, isti sadrži 50 – 100 µg gosipola. Kod određivanja ukupnog gosipola, ispitivani uzorak iznosi 0,5 – 5 g, tako da alikvot filtrata od 2 ml sadrži 40 – 200 µg gosipola.

Analiza se sprovodi na sobnoj temperaturi na približno 20 °C.

5.2. Određivanje slobodnog gosipola

Uzorak se prenese u tikvicu sa brušenim grlom zapremine 250 ml, čije je dno prekriveno drobljenim staklom. Pipetom se doda 50 ml rastvarača A (tačka 3.2.), tikvica se zatvori i miješa jedan sat na mješalici. Filtrira se kroz suvi filter i filtrat prikupi u maloj tikvici s brušenim grlom. Tokom filtriranja lijevak se prekrije sahatnim staklom.

Pipetom se u svaku od dva suda zapremine 25 ml (A i B) prenesu jednaki alikvoti filtrata, koji sadrže 50 – 100 µg gosipola. Prema potrebi se dopune rastvaračem A (tačka 3.2.) do 10 ml. Sud (A) se do oznake dopuni smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.). Ovaj se rastvor koristi kao referentni rastvor za mjerenje rastvora uzorka.

Pipetom se u svaku od dva druga suda zapremine 25 ml (C i D) prenese 10 ml rastvarača A (tačka 3.2.). Sud (C) se do oznake dopuni smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.). Ovaj rastvor se koristi kao referentni rastvor za mjerenje rastvora slijepe probe.

U sudove (D) i (B) se doda po 2 ml anilina (tačka 3.4.). Grije se 30 minuta nad vrelim vodenim kupatilom, do obojenja. Ohladi se na sobnoj temperaturi, dopuni do oznake smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.), homogenizuje i ostavi jedan sat.

Optička gustina rastvora iz slijepe probe (D) odredi se upoređivanjem s referentnim rastvorom (C), a optička gustina rastvora uzorka (B) upoređivanjem s referentnim rastvorom (A) u spektrofotometru na 440 nm sa staklenim kivetama veličine 1 cm.

Oduzme se optička gustina rastvora slijepe probe od optičke gustine rastvora uzorka (= korigovana optička gustina). Iz te se vrijednosti izračunava udio slobodnog gosipola, u skladu s tačkom 6.

5.3. Određivanje ukupnog gosipola

U sud zapremine 50 ml prenese se ispitivani uzorak sa 1 – 5 mg gosipola i doda 10 ml rastvarača B (tačka 3.3.). Istovremeno se pripremi slijepe proba, tako da se u drugi sud zapremine 50 ml prenese 10 ml rastvarača B (tačka 3.3.). Oba suda se griju 30 minuta iznad vrellog vodenog kupatila. Ohlade se na sobnoj temperaturi, svaki sud se dopuni do oznake smješom propan-2-ola i heksana (tačka 3.1.). Homogenizuje se i ostavi 10 – 15 minuta da se istaloži, zatim se filtrira u tikvicu sa brušenim grlom.

U dva suda zapremine 25 ml pipetom se prenese po 2 ml filtrata uzorka, a u druga dva suda zapremine 25 ml po 2 ml filtrata slijepe probe. Po jedan sud iz svake serije dopuni se do 25 ml smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.). Ovi rastvori se koriste kao referentni rastvori.

U svaki od preostala dva suda doda se 2 ml anilina (tačka 3.4.). Zagrijavaju se 30 minuta iznad vrellog vodenog kupatila do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnoj temperaturi, dopuni smješom propan-2-ola i heksana (tačka 3.1.) do 25 ml, homogenizuje i ostavi jedan sat.

Optička gustina slobodnog gosipola određuje se u skladu sa tačkom 5.2. Iz te vrijednosti se izračunava udio ukupnog gosipola, u skladu s tačkom 6.

6. Izračunavanje rezultata

Rezultati se mogu izračunati bilo iz specifične optičke gustine (tačka 6.1.) ili iz kalibracione krive (tačka 6.2.).

6.1. Iz specifične optičke gustine

Specifične optičke gustine, pri opisanim uslovima, su sljedeće:

Slobodni gosipol:	E (1%/1cm)=625
Ukupni gosipol:	E (1%/1cm)=600

Udio slobodnog ili ukupnog gosipola u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$\% \text{ gosipol} = E \times 1250 / E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot p \cdot a$$

pri čemu je:

E = korigovana optička gustina, određena u skladu s tačkom 5.2.,

p = masa ispitivanog uzorka u gramima,

a = alikvot filtrata u mililitrima.

6.2. Iz kalibracione krive

6.2.1. Slobodni gosipol

Pripreme se dvije serije po pet sudova zapremine 25 ml. U svaku seriju sudova pipetom se prenese alikvoti od 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml standardnog rastvora gosipola A (tačka 3.5.). Rastvaračem A (tačka 3.2.) se dopuni do 10 ml. Svaka se serija dopuni jednim sudom zapremine 25 ml koja sadrži samo 10 ml rastvarača A (tačka 3.2.) (slijepe proba).

Sud iz prve serije (uključujući sud za slijepu probu) dopuni se do 25 ml smješom propan-2-ola i heksana (tačka 3.1.) (referentna serija).

U svaki sud iz druge serije (uključujući sud za slijepu probu) doda se 2 ml anilina (tačka 3.4.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrellog vodenog kupatila do nastanka obojenja. Ohladi se na sobnoj temperaturi, dopuni do oznake smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.), homogenizuje i ostavi jedan sat (standardna serija).

Optička gustina rastvora iz standardne serije i odgovarajućih rastvora iz referentne serije odredi se u skladu s tačkom 5.2. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustine u odnosu na količine gosipola (u µg).

6.2.2. Ukupni gosipol

Pripremi se šest sudova zapremine 50 ml. U prvi sud se prenese 10 ml rastvarača B (tačka 3.3.), a u ostale 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml standardnog rastvora gosipola B (tačka 3.6.). Svaki sud se dopuni do 10 ml rastvaračem B (tačka 3.3.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrelog vodenog kupatila. Ohladi se na sobnoj temperaturi, dopuni do oznake smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.) i homogenizuje.

Prenese se po 2,0 ml svakog od navedenih rastvora u svaku od dvije serije od po šest sudova zapremine 25 ml. Sudovi iz prve serije se dopune se do 25 ml smješom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.) (referentna serija).

U svaki od sudova iz druge serije doda se 2 ml anilina (tačka 3.4.). Zagrijava se 30 minuta iznad vrelog vodenog kupatila. Ohladi se na sobnoj temperaturi, dopuni do oznake smjesom propan-2-ol-heksana (tačka 3.1.), homogenizuje i ostavi jedan sat (standardna serija).

Optička gustina rastvora iz standardne serije i odgovarajućih rastvora iz referentne serije odredi se u skladu s tačkom 5.2. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se u dijagram unesu izmjerene optičke gustine u odnosu na količine gosipola (u µg).

6.3. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije preći:

- 15 % više vrijednosti za udio gosipola manji od 500 ppm,
- 75 ppm apsolutne vrijednosti za udio gosipola od 500 – 750 ppm,
- 10 % više vrijednosti za udio gosipola veći od 750 ppm.

ODREĐIVANJE NIVOVA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-a Metode uzimanja uzoraka i tumačenje rezultata analize

Dio II

1. Predmet i područje primjene

Uzorci za službenu kontrolu nivoa polihlorovanih dibenzo-p-dioksina (PCDD polihlorovanih dibenzofurana (PCDF), polihlorovanih bifenila sličnih dioksinu (PCB)¹ i PCB-a koji nisu slični dioksinu u hrani uzimaju se u skladu u skladu sa propisom kojim su uređeni zahtjevi za higijenu hrane za životinje i nepoželjne supstance u hrani za životinje.

Skrining metode su metode koje se koriste za selekciju onih uzoraka sa nivoima PCDD/PCDF-a i PCB-a sličnih dioksinu koje prelaze maksimalno dozvoljene količine. One omogućavaju troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata sa velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Skringing metode temelje se na bioanalitičkim i GC-MS metodama. Rezultati analize uzoraka koji prelaze cut-off vrijednost za provjeru usklađenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom provjeravaju se kompletnom ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrdnom metodom.

Potvrđne metode su metode koje obezbjeđuju potpune ili dodatne informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantifikaciju maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a. Za potvrđne metode koriste se gasna hromatografija i masena spektrometrija visoke rezolucije (GC-HRMS) ili gasna hromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Usklađenost serije ili podserije sa maksimalno dozvoljenom količinom

2.1. U pogledu PCB-a koji nisu slični dioksinu

Serija se prihvata ako analitički rezultat ne prelazi maksimalno dozvoljenu količinu za PCB-a koji nijesu slični dioksinu. Serija nije u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje ako gornji² analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom³, prelazi maksimalno dozvoljene količine uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usaglašenosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu sa jednim od sljedećih pristupa:

- obračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95%. Serija odnosno podserija nije usaglašena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine,
- postavljanjem granične količine (CCα) u skladu sa odredbama Pravilnika o metodama kontrole rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ("Službenom listu CG", broj 45/14) (tačka 2.1.2.5. Priloga I) primjer materija sa određenom dozvoljenom količinom). Serija ili podserija je neusaglašena ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CCα.

Odredbe ove tačke primjenjuju se na rezultate analize dobijene iz uzorka za službene kontrole, a slučaju potrebe za dodatnim analizama ili referentne potrebe, primjenjuju se nacionalni propisi.

2.2. U pogledu PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-a

Serija je u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama ako rezultat pojedinačne analize:

- sprovedene skrining metodom sa sadržajem lažno usklađenih rezultata manjim od 5% ukazuje da nivo ne prelazi maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i sume PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje,
- sprovedene potvrdnom metodom ne prelazi maksimalno dozvoljene količine PCDD/PCDF-a i sume PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a

¹ - Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za dioksine, furane i PCB-e slične dioksinu: WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na temelju zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005. (Martin van den Berg et al., Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i jedinjenja slična dioksinu kod ljudi i sisara Svjetske zdravstvene organizacije, provedena 2005. Toksikološke nauke 93(2), 223.–241. (2006.))

Kongener	Vrijednost TEF-a	Kongener	Vrijednost TEF-a
<i>Dibenzo-p-dioksini („PCDD“) i Dibenzo-p-furani („PCDF“)</i>		<i>PCB-i „slični dioksinu“ Ne-orto PCB-i + Mono-orto PCB-i</i>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Ne-orto PCB-i	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
		Mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Korišćene skraćenice „T“ = tetra; „Pe“ = penta; „Hx“ = heksa; „Hp“ = hepta; „O“ = okta; „CDD“ = hlordibenzo-p-dioksin; „CDF“ = hlordibenzofuran; „CB“ = hlorbifenil.

² Pojam „gornji“ zahtijeva primjenu limita kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera. Pojam „donji“ zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera. Pojam „srednji“ zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera.

³ Opšte, primjenjuju se zahtjevi za duplu analizu kao što je predviđeno u Prilogu II. poglavlja C tačke 3. Međutim, za potvrđne metode upotrebom C¹³-obilježenog internog standarda za odgovarajuće analite, potrebna je dupla analiza samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju potvrđne metode nije usklađen. Dupla analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje duplom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem porijekla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dozvoljene količine.

utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Za skrining testove potrebno je odrediti *cut-off* vrijednost za odluku o usklađenosti sa maksimalno dozvoljenim količinama određenim za PCDD/PCDF ili za sumu PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a.

Serijska nije u skladu sa maksimalno dozvoljenim količinama utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje, ako gornji⁴ analitički rezultat dobijen potvrđnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom, prelazi bez sumnje maksimalno dozvoljenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost⁵. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu sa jednim od sljedećih pristupa:

- obračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95%. Serijska odnosno podserijska nije usklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene maksimalno dozvoljene količine. U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksinu slični PCB-i, tada se koristi suma procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a zasebno, kako bi se dobila suma PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a.
- postavljanjem granične količine (CC_α) u skladu sa odredbama Pravilnika o metodama kontrole rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ("Službenom listu CG", br. 45/2014) (tačka 2.1.2.5. Priloga I) primjer materije sa određenom dozvoljenom količinom. Serijska ili podserijska nije usklađena ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC_α.

Odredbe ove tačke primjenjuju se na rezultate analize dobijene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe za dodatnim analizama ili referentne potrebe, primjenjuju se nacionalni propisi.

3. Rezultati koji prelaze nivo potreban za pokretanje postupka utvrđenih propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje

Nivoi potrebni za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u kojima je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i preduzeti mjere za smanjenje ili uklanjanje. Skrining metode uspostavljaju odgovarajuće *cut-off* vrijednosti za uzorake. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije sprovode se samo ako je pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrđnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost⁶.

Dio III

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-a u određenoj hrani

1. Područje primjene

Zahtjevi iz ovog dijela primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polihlorovanih dibenzo-p-dioksina i polihlorovanih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih polihlorovanih bifenila (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe.

Monitoring prisustva PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u hrani može se vršiti sljedećim metodama:

(a) Skrining metode

Cilj skrining metoda je odabir uzoraka sa nivoima PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a koje prelaze maksimalno dozvoljene količine ili nivo potreban za pokretanje postupka. Skrining metode treba da omoguće efikasnu veliku propusnost uzoraka i povećanje mogućnost za otkrivanje novih incidenata sa velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati, a mogu uključivati bioanalitičke metode i GC-MS metode.

Skrining metode pored analitičkih rezultata sa *cut-off* vrijednošću, iz kojih proizilazi DA ili NE odluka u pogledu mogućeg prelazanja maksimalno dozvoljene količine ili nivoa za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima za koje se sumnja da su neusklađeni sa maksimalno dozvoljenom količinom mora biti određena/potvrđena potvrđnom metodom.

Osim toga, skrining metode mogu pokazati nivoe PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih skrining metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizičko-hemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Brojčano navedeni rezultati skrining metoda odgovarajući su za dokazivanje usklađenosti ili sumnje na neusklađenost ili prelazanja nivoa potreban za pokretanje postupka i pokazuju raspon nivoa u slučaju daljnjeg praćenja pomoću potvrđenih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količine prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena nivoa potrebnog za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljene količine.

(b) Potvrđne metode

Potvrđne metode omogućavaju određivanje količine PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorku i obezbjeđuju punu informaciju na nivou kongenera. S toga te metode omogućavaju kontrolu maksimalno dozvoljenih količina i potrebnog nivoa za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobijenih skrining metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenja vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene potrebnog nivoa za pokretanje postupka i maksimalno dozvoljenih količina. One su važne i za određivanje uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje usaglašenosti ili neusaglašenosti sa maksimalno dozvoljenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. NAPOMENE:

Za obračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih materija u datom uzorku pomnože se njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF), a zatim sabere kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinu sličnih jedinjenja izraženih kao TEQ.

Za potrebe ovog dijela B, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najniža koncentracija analita koja se može izmjeriti sa prihvatljivom statističkom sigurnošću, ispunjavajući kriterijume identifikacije koji su opisani u međunarodno priznatim standardima, npr. u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u metodi EPA 1613 i 1668 kako su revidovani.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

(a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi reagovanje instrumenta na dva različita jona koji se prate uz odnos signala i šuma (signal/šum)

3:1 pri manje osjetljivom signalu; ili

(b) ako zbog tehničkih razloga obračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, najniža tačka koncentracije na kalibracionoj krivoj koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičke serije uzoraka) odstupanje prosječnom faktoru relativnog odgovora izračunato za sve tačke na kalibracionoj krivoj u svakoj seriji uzoraka. LOQ se računa iz najniže kalibracione tačke uzimajući u obzir reagovanje (*recovery*) internih standarda i unos uzorka

Bioanalitičke skrining metode ne daju rezultate na nivou kongenera, već samo navode⁷ vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), kvizior na to da sve komponente prisutne u ekstraktu uzorka koji proizvode odgovor pri ispitivanju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.

Skrining i potvrđne metode mogu se upotrijebiti za kontrolu određenog matriksa samo ako su dovoljno osjetljive za pouzdano utvrđivanje količina koje su na potrebnom nivou za pokretanje postupka ili maksimalno dozvoljene količine.

3. Zahtjevi za obezbjeđivanje kvaliteta

3.1. Mjere za sprječavanja uzajamne kontaminacije moraju se preduzeti tokom uzimanja uzoraka i analize.

3.2. Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u posudama od stakla, aluminijuma, polipropilena ili polietilena koje su odgovarajuće za čuvanje i ne utiču na sadržaj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz posuda.

3.3. Skladištenje i prevoz moraju biti sprovedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.

3.4. Svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljati i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti, prema potrebi.

⁴ Pojam „gornji” zahtjeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam „donji” zahtjeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam „srednji” zahtjeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračunavanje doprinosa svakog pojedinačnog nekvantifikovanog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

⁵ Opšte, primjenjuju se zahtjevi za duplu analizu iz Priloga II. poglavlja C tačke 3. Međutim, za potvrđne metode upotrebom ¹³C-obilježenog internog standarda za odgovarajuće analize, dupla analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrđne metode nije usklađen. Dupla analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje duplom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem porijekla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dozvoljene količine.

⁶ Jednako obrazloženje i zahtjevi za duplu analizu za kontrolu nivoa potrebnih za pokretanje postupka kao u bilješci (42) za najveće dozvoljene količine.

⁷ Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje jedinjenja kongenera uključenih u sistem TEF. Druga strukturno povezana jedinjenja koja se vežu na receptor aromatičnih ugljovodoničnih (AhR) mogu biti prisutni u ekstraktu uzorka što pridonosi opštem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena, već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

3.5. Od opšte je važnosti kontrola reagenasa, stakla i opreme, zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ

3.6. Slijevu probu treba analizirati, sprovodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.

3.7. Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva stakla i rastvori koji se koriste u analizi ispitani i da su slobodni od jedinjenja koji interferiraju prilikom detekcije ciljanih komponenti u radnom obimu. Staklo treba isprati rastvorima ili/ grijati na temperaturama koje su pogodno za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih jedinjenja i interferirajućih jedinjenja sa njene površine.

3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na nivou maksimalno dozvoljene količine ili potrebnog nivoa za pokretanje postupka.

3.9. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za proizvode koji se ispituju moraju biti u skladu sa međunarodno priznatim smjernicama.

4. Zahtjevi za laboratorije

4.1. Laboratorije treba da su akreditovane u skladu sa zakonom, sa zahtjevima ISO vodiča br. 58 (radi obezbjeđenja analitičkog kvaliteta) i u skladu sa standardom MEST EN ISO/IEC 17025:2011 i u skladu sa propisom kojim je uređena bezbjednost hrane.

4.2. Laboratorije treba da kontinuirano učestvuju u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u relevantnim matriksima hrane i rasponima koncentracija.

4.3. Laboratorije koji sprovode skrining metode pri rutinskim kontrolama uzoraka treba da uspostave saradnju sa laboratorijima koji sprovode potvrdne metode zbog kontrole kvaliteta i potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF) i dioksinu slične PCB-e

5.1. Nizak radni opseg i granica kvantifikacije

Za PCDD/PCDF, osjetljivost određivanja mora biti na nivou pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih jedinjenja. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-a (posebno ne-orto supstituisanih kongenera) donja granica radnog obima mora dostići donje pikogramsko područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-a, dovoljan je nivo kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

5.2.1. Potrebno je praviti razliku između PCDD-a, PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahovanih i vjerovatno interferirajućih jedinjenja, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), treba praviti razliku između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituisanih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.

5.2.2. Bioanalitičke metode moraju biti u stanju da detektuju ciljana jedinjenja kao sumz PCDD/PCDF-a i/ili dioksinu sličnih PCB-a. Prečišćavanje uzorka ima za cilj uklanjanje jedinjenja koji uzrokuju lažnu neusklađenost rezultata ili jedinjenja koji mogu smanjiti odgovor i prouzrokovati lažno usklađene rezultate.

5.3. Visoka tačnost (istinitost i preciznost, očito iskorišćenje pri biološkim testovima)

5.3.1. Kod metoda GC-MS određivanje treba da obezbjedi validnu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenog) potrebna je da bi se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na osnovu nepouzdanje procjene rezultata TEQ-a. Tačnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u sertifikovanom materijalu i njegove sertifikovane vrijednosti, izražene kao procenat ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobijenih u uslovima obnovljivosti (reproducibility)).

5.3.2. Kod bionalitičkih metoda potrebno je odrediti očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima. Očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima znači nivo BEQ-a izračunat iz kalibracione krive TCDD-a ili PCB-a 126, korigovana za vrijednost slijepe probe i zatim podijeljena sa vrijednosti TEQ-a, koja je određena potvrdnom metodom. Njegova namjena je ispravljanje faktora poput gubitka PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih jedinjenja tokom postupka ekstrakcije i prečišćavanja, povećavanje ili smanjivanje odgovora koekstrahovanih jedinjenja (agonistički i antagonistički efekti), kvalitet prilagođavanja krive, ili razlike između vrijednosti faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF) i relativne potencije (REP). Očigledno iskorišćenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka, koji imaju reprezentativnu raspodjelu kongenera u blizini predmetnog nivoa.

5.4. Validnost u rasponu maksimalno dozvoljene količine i opšte mjere za kontrolu kvaliteta

5.4.1. Laboratorije moraju dokazati efikasnost izvođenja metode u određenom rasponu maksimalno dozvoljene količine, npr. 0.5x, 1x i 2x većom količinom od maksimalno dozvoljene količine, sa prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tokom postupka validacije i/ili rutinske analize.

5.4.2. Redovne slijepe probe i ogledi sa dodavanjem (spajkovanjem) ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je sertifikovanireferentni materijal) sprovode se kao mjere unutrašnje kontrole kvaliteta. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, ogleda sa dodavanjem (spajkovanjem) ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se sprovođenje analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. Granica određivanja (LOQ)

5.5.1. Za bioanalitičku skrining metodu, određivanje LOQ nije potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijevu probu od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se nivo izvještavanja zbog postupanja sa uzorcima koji daju odgovor ispod tog nivoa. Za nivo izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepom probom sa odgovorom ispod radnog raspona. Stoga se izračunava na temelju uzoraka koji sadrže ciljana jedinjenja blizu najniže zahtijevanog nivoa, a ne iz odnosa između signala i šuma ili slijepe probe.

5.5.2. Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu treba da bude približno jedna petina maksimalno dozvoljene količine.

5.6. Analitički kriterijum

Za pouzdane rezultate potvrdnih ili skrining metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriterijumi u rasponu maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbroj PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e:

	Skrining metode sa bioanalitičkim ili fizičko-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usklađenih rezultata (%)	<5%	
Istinitost		- 20% do +20%
Ponovljivost (repeatability) (RSD_r)	<20%	
Unutar laboratorijska obnovljivost(RSD_R)	< 25%	<15%
(1) U odnosu na maksimalno dozvoljene količine.		

5.7. Posebni zahtjevi za skrining metode

5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u tački 6. Za čelijske bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u tački 7.

5.7.2. Laboratorije koje sprovode skrining metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku suradnju sa laboratorijama koji sprovode potvrdnu metodu.

5.7.3. Tokom rutinske analize potrebno je sprovesti provjeru mogućnosti skrining metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrednovanja metoda. Kontinuirano se mora sprovoditi program za kontrolu usklađenosti rezultata.

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja čelijskog odgovora i citotoksičnosti:

20% izolata uzoraka mjeri se u rutinskom skrining pregledu bez i sa dodatim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara maksimalno dozvoljene količini ili nivou potrebnog za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u ekstraktu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka sa dodatkom (spajkom) poredi se sa sumom koncentracija ekstrakta bez dodatka i koncentracije koja je dodata (spajkovana) Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25% manja od izračunate (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i date rezultat treba podvrći potvrdnoj analizi GC-HRMS. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvaliteta.

5.7.5. Kontrola kvaliteta usklađenih uzoraka:

Otprike od 2% do 10% usklađenih uzoraka, zavisno od matriksa uzorka i laboratorijskog iskustva, biće potvrđena GC-HRMS analizom.

5.7.6. Određivanje učestalosti lažno usklađenih rezultata na temelju podataka QC:

Određuje se učestalost lažno usklađenih rezultata dobijenih skrining metodama analize uzoraka ispod i iznad maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usklađenih rezultata mora biti ispod 5%. Kada je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matriksu/grupi matriksa dostupno iz kontrole kvaliteta usklađenih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usklađenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tokom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2x maksimalno dozvoljene količine (MDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su skrining metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze nivo potreban za pokretanje postupka, kriterijum za određivanje lažno usklađenih rezultata je maksimalno dozvoljena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrđne metode.

5.7.7. Mogući neusklađeni rezultati iz skrining metode moraju se uvijek provjeriti komplet ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrđnom metodom. Ti se uzorci mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Kod skrining metoda učestalost „lažnih usklađenih rezultata“ je dio rezultata za koje je potvrđeno da su usklađeni potvrđnom analizom, dok je prethodnom skrining metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usklađen. Međutim, procjena prednosti skrining metode zasniva se na upoređivanju lažno usklađenih rezultata sa ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba skrining metode korisna.

5.7.8. Bioanalitičke metode moraju barem u uslovima validnosti tačno pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ.

I kod bioanalitičkih metoda sprovedenih u uslovima ponavljanja, unutar-laboratorijska ponovljivost RSD, je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R.

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati metode GC-MS za skrining ili potvrđne metode

6.1. Prihvatljive razlike između gornje i donje granice nivoa WHO-TEQ

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20% da bi se potvrdilo prelaženje maksimalno dozvoljene količine ili u slučaju potrebe prelaženja nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

6.2. Kontrola iskorišćenja (Control of recoveries)

6.2.1. Dodavanje ¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituisanih internih standarda za PCDD/PCDF i ¹³C-označenih internih standarda za dioksinu slične PCB-e je potrebno sprovesti na samom početku analize, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorirane homologne grupe za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne grupe za dioksinima slične PCB-e (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani jon u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-a odnosno dioksinima sličnih PCB-a). U slučaju potvrđnih metoda koristi se svih 17 ¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituisanih internih standarda za PCDD/PCDF-e i svih 12 ¹³C-označenih internih standarda za dioksinu slične PCB-e.

6.2.2. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ¹³C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajući kalibracioni rastvori.

6.2.3. Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10% masti, interni standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog porijekla u kojoj je sadržaj masti veći od 10%, interni standardi se mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se sprovesti odgovarajuće vrednovanje efikasnosti ekstrakcije, što zavisi od toga dodaje li se interni standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome izražavaju li se rezultati na sadržaj masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

6.2.4. Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorišćenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolisati iskorišćenje. Za potvrđne metode, iskorišćenje pojedinačnih internih standarda mora biti u rasponu između 60% i 120%.

Manje ili veće iskorišćenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10% ukupne TEQ vrijednosti (dobijene na osnovu zbira PCDD/PCDF-a i dioksinima sličnih PCB-a). Za skrining metode GC-MS iskorišćenje mora biti u rasponu između 30% i 140%.

6.3. Uklanjanje interferirajućih materija

- Odvajanje PCDD/PCDF-a od interferirajućih hlorovanih jedinjenja kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i hlorovani difenil eteri se sprovodi pomoću odgovarajućih hromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone sa florisilom, aluminijum-oksidiom i/ili aktivnim ugljem).
- Razdvajanje izomera gasnom hromatografijom mora biti zadovoljavajuće (<25% od pika do pika između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. Kalibracija sa standardnom krivom

Raspon kalibracione krive mora obuhvatati relevantni raspon maksimalno dozvoljenih količina ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

6.5. Posebni zahtjevi za potvrđne metode

- Za GC-HRMS:
- U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10000 za cijeli maseni raspon pri 10% najmanjeg razmaka između dva pika vrijednosti jednakog intenziteta.

Ispunjavanje daljih kriterijuma za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim standardima, na primjer u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

- Za GC-MS/MS:
- Praćenje barem dva specifična prekursora jona, svakog sa jednim posebnim odgovarajućim prelaznim jonom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize.

Najveće dozvoljeno odstupanje relativnih intenziteta jona od $\pm 15\%$ za odabranu tranziciju jona produkta u poređenju sa izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjek iz kalibracionih normi), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak gasa kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dovoljna da dva pika razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja ispitivanih analita.

Ispunjavanje zahtjeva međunarodno priznatih standarda, na primjer u standardu MEST EN 16215:2014 (Hrana za životinje - Određivanje dioksina i PCB-a sličnih dioksinu GC/HRMS-om i indikatora PCB-a GC/HRMS-om) i/ili u revidiranim metodama EPA 1613 i 1668, osim obaveze da se koristi GC-HRMS.

7. Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode

Bioanalitičke metode su metode zasnovane na upotrebi bioloških načela kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na bazi receptora ili imunološki testovi.

Skrining metoda klasifikuje uzorak kao usklađen ili kao sumnjiv da nije usklađen. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ upoređuje se sa *cut-off* vrijednošću. Uzorci ispod *cut-off* vrijednosti smatraju se usklađenima, za uzorke jednake ili iznad *cut-off* vrijednosti sumnja se da nisu usklađeni, što zahtijeva analizu potvrđnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 maksimalno dozvoljene količine može se koristiti kao najprimjerenija *cut-off* vrijednost obezbjeđujući učestalost lažno usklađenih rezultata ispod 5% i prihvatljivu učestalost lažno neusklađenih rezultata. Kako su maksimalno dozvoljene količine odvojene za PCDD/PCDF i za zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a, provjera usklađenosti uzoraka bez frakcionisanja zahtijeva odgovarajuće *cut-off* vrijednosti za PCDD/PCDF-e kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze nivoa potrebne za pokretanje postupka, odgovarajući procenat nivoa potrebnog za pokretanje postupka može se koristiti kao *cut-off* vrijednost.

Kod nekih bioanalitičkih metoda okvira vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze nivo izvještavanja.

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opšti zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracione krive za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krive pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15%. Donji dio radnog raspona (nivo izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70% najveće efikasne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15%. Radni raspon se određuje tokom validacije. *Cut-off* vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.
- Standardni rastvori i ekstrakti uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardni rastvori ili ekstrakti kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarčića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na temelju CV<15%.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivom

- Nivoi u uzorcima mogu se procijeniti upoređivanjem odgovora na ispitivanje s kalibracionom krivom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-a/dioksinu sličnih PCB-a) za obračun BEQ vrijednosti u ekstraktu i kasnije u uzorku.
- Kalibraciona kriva sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) sa dovoljno koncentracija u donjem dijelu krive (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagodljivosti krive u radnom rasponu. Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagođavanja pri nelinearnoj regresiji. Bolje prilagođavanje postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krive (npr. smanjivanjem zbira kvadrata reziduala).
- Procijenjena vrijednost u ekstraktu uzorka zatim se koriguje za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matriksa/rastvora (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvora i hemikalija) i za očito iskorišćenje (izračunano iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka sa

reprezentativnim uzorcima kongenera u području maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka). Za korekciju iskorišćenja, očigledno iskorišćenje treba uvijek biti unutar zahtijevanog raspona. Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorišćenja treba da su usklađeni sa zahtjevima iz tačke 7.2. ovog dijela.

7.1.2.2. Kalibracija sa referentnim uzorcima

Druga mogućnost je da se da se u blizini ciljnog nivoa upotrijebi kalibraciona kriva pripremljena iz bar četiri referentna uzorka jedan matriks slijepe probe i tri referentna uzorka sa 0,5x, 1,0x i 2,0x većom vrijednosti od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka) zbog čega korekcija vrijednosti slijepe probe i iskorišćenja više nije potrebna. U ovom slučaju se može odgovor testa koji odgovara 2/3 maksimalno dozvoljene količine izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze nivoa potrebne za pokretanje postupka, odgovarajući procenat nivoa potrebnog za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a

Ekstrakti se mogu podijeliti u frakcije koje sadrže PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibraciona kriva PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-e.

7.1.4. Očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima

„Očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima” izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka sa reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka i izražava se kao procenat vrijednosti BEQ u komparaciji sa vrijednošću TEQ. Zavisno od vrste ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF-ova⁸, razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-e mogu prouzrokovati manje očito iskorišćenje za dioksinu slične PCB-e u poređenju s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se sprovedi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a očito iskorišćenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-e 25% do 60%, za PCDD/PCDF-e od 50% do 130% (rasponi važe za kalibracionu krivu TCDD). S obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-a sumi PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a može varirati kod različitih matriksa i uzoraka, očigledno iskorišćavanje pri biološkim testovima za parametar sume odražava ove raspone koji iznose od 30% do 130%. Bilo koja implikacija bitno revidiranih vrijednosti TEF-a na zakonodavstvo Unije za PCDD/PCDF-e i dioksinu slične PCB-e zahtijeva reviziju ovih raspona.

7.1.5. Kontrola iskorišćenja prečišćavanja

Gubitak jedinjenja tokom prečišćavanja uzorka provjerava se tokom validacije. Slijepe proba sa dodatkom mješavine različitih kongenera se podvrgava prečišćavanju (najmanje n=3), a iskorišćenje i varijabilnost provjeravaju se potvrdnom analizom. Iskorišćenje iznosi od 60% do 120% naročito za kongenere koji doprinose više od 10% vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Nivoi izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, nivo izvještavanja se određuje na osnovu odgovarajućih matriksa uzoraka koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovu kalibracione krive standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krive. Efekti ekstrakcije i prečišćavanja se uzimaju u obzir. Nivo izvještavanja se određuje značajno iznad postupka sa uzorcima slijepe probe (najmanje tri puta više).

7.2. Korišćenje referentnih uzoraka

7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju uzorke matriksa, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-e oko maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potreban za pokretanje postupka.

7.2.2. Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje uključuje se jedna slijepe proba ili po mogućnosti slijepe proba datog matriksa i jedan referentni uzorak sa maksimalno dozvoljenom količinom ili na nivo potrebnog za pokretanje postupka. Ovi uzorci se ekstrahuju i analiziraju istovremeno u istim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepe proba, što obezbjeđuje ispravnost testa, a uzorci se mogu koristiti za korekciju slijepe probe i iskorišćenja.

7.2.3. Referentni uzorci koji se odaberu za korekciju iskorišćenja su reprezentativni za ogledne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka. Ako se kombinuju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u oglednim uzorcima.

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bionalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracijskim ogledima u matriksu, koji uključuju referentne uzorke sa dodatkom (spajkom) 0, 0,5x, 1x i 2x maksimalno dozvoljene količine (MDK) sa šest ponavljanja na svakom nivou (n=24)). Faktori korekcije (slijepe proba i iskorišćenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali se moraju provjeravati u svakoj seriji ispitivanja u skladu sa tačkom 7.2.2. ovog priloga.

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o usklađenosti uzorka sa maksimalno dozvoljenim količinama ili za kontrolu nivoa potrebnog za pokretanje postupka, ako je relevantno, s obzirom na dotičnu maksimalno dozvoljenu količinu ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-e i za dioksinu slične PCB-e ili za sumu PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a. Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na bazi 95% nivoa povjerenja, što znači da je sadržaj lažno usklađenih rezultata <5% i na osnovu RSD_R<25 %. Odlučujuća granica potvrdne metode je maksimalno dozvoljene količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način:

7.3.1. Korišćenje donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode:

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{ED}} - S_{y,x} \cdot t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + \frac{x_i - \bar{x}}{\bar{x}}^2 / Q_{xx}}$$

gdje je:

BEQ_{DL} - BEQ koji odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je maksimalno dozvoljena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost

S_{y,x} - standardna devijacija rezidua

t_{α, f=m-2} - student faktor (α=5%, f=stepeni slobode, jednostrani)

m - ukupan broj kalibracionih tačaka (indeks j)

n - broj ponavljanja na svakom nivou

x_i - koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske tačke i određena potvrdnom metodom

$\bar{x}$ - srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibracionih uzoraka

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m x_j - \bar{x}^2$ - Q_{xx} - parametar zbira kvadrata, i = indeks za kalibracionu tačku i

7.3.2. Obračun iz bioanalitičkih rezultata (korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) višestrukih analiza uzoraka (n ≥ 6) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode, kao donja krajnja tačka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

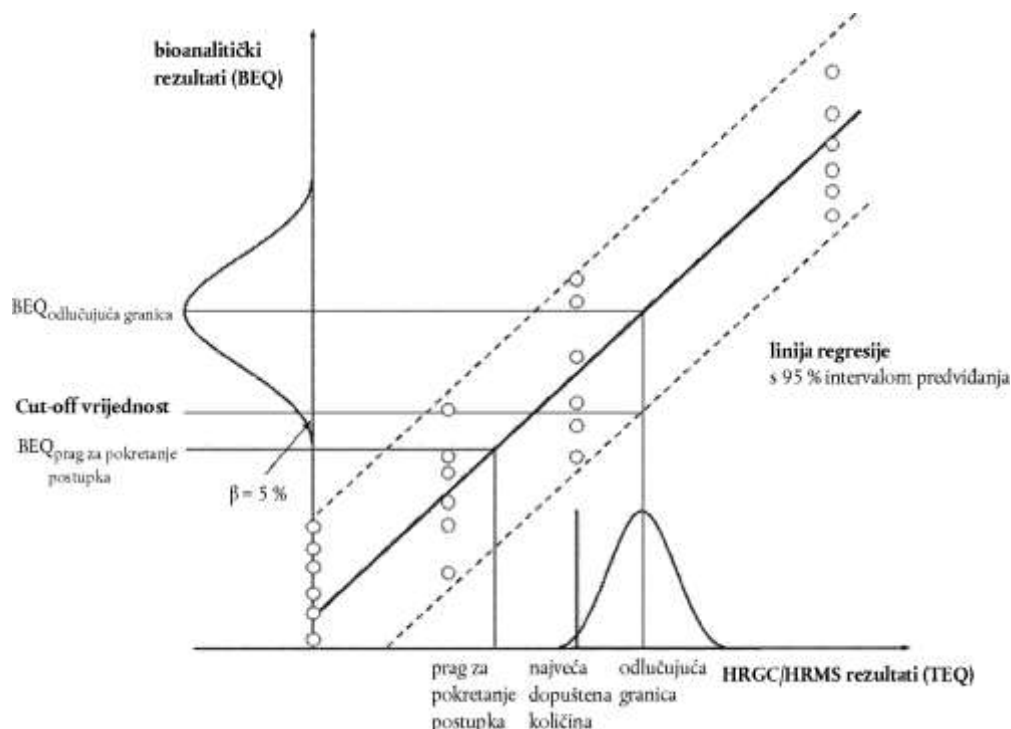
$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

gdje je:

SD_R - standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL}, izmjereno u unutar laboratorijskim uslovima obnovljivosti

7.3.3. Obračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigovano za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenje) iz višestrukih analiza uzoraka (n≥6) kontaminiranih na 2/3 maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, što se zasniva na zapažanju o kretanju vrijednost oko cut-off vrijednosti datih u tač. 7.3.1. ili 7.3.2. ovog dijela.

⁸ Trenutni zahtjevi temelje se na TEF vrijednostima objavljenim u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223.–241. (2006.).



Obračun cut-off vrijednosti na osnovu 95% nivoa povjerenja, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata $< 5\%$ i na osnovu $RSD_R < 25\%$:

1. iz donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrđne metode;
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrđne metode kao donja krajnja tačka distribucije (na slici prikazana krivom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti:

Cut-off vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka sa različitim uzorcima matriksa/kongenera mogu biti veće od maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka, na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobijene kada je potrebno kontrolisati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim slučajevima se cut-off vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25\%$, ili se daje prednost 2/3 maksimalno dozvoljene količine ili nivoa potrebnog za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvodljivosti (Performance characteristic)

7.4.1. U bioanalitičkim metodama ne mogu se koristiti interni standardi, već se sprovode ispitivanja ponavljanja kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponavljanje mora biti manja od 20%, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25%. To se bazira na nivoima izračunatih u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorišćenja.

7.4.2. U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i nivoa na cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti.

7.4.3. Moraju se utvrditi ciljna jedinjenja, moguće interference i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.

7.4.4. Procenat standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunat iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju ekstrakta uzorka ne smije biti iznad 15%.

7.4.5. Nekorigovani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri maksimalno dozvoljenoj količini ili nivou potrebnom za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvodljivosti bioanalitičke metode u konstantnom vremenskom periodu.

7.4.6. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa uzorcima slijepe probe i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se obezbjedilo da je izvodljivost analiza u skladu sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepom probom u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolisati kako bi se izbjegli lažno usklađeni rezultati kada se oduzimaju.

7.4.7. Rezultati analiza sumnjivih uzoraka dobijenih potvrđnim metodama i 2 do 10% usklađenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matriksu) sakupljaju se i koriste za procjenu izvodljivosti skrining metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka može se koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validovane matrikse.

7.4.8. Uspješna izvodljivost metoda može se takođe dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2x maksimalno dozvoljene količine, mogu takođe biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata, ako laboratorija može dokazati uspješnu izvodljivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.

7.4.9. Tokom incidenata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir specifičan matriks i kongenere koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. Izvještavanje o rezultatima

8.1. Potvrđne metode

8.1.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dozvoljava, analitički rezultati moraju sadržati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-a i kongenera dioksina sličnih PCB-a i treba ih definisati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

8.1.2. U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksina sličnih PCB-a.

8.1.3. Iskorišćenja individualnih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su van raspona iz tačke 6.2.5. ovog dijela, u slučaju da je dobijeni rezultat veći od maksimalno dozvoljene količine (u tom slučaju iskorišćenje za jednu od dvije duple analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.

8.1.4. S obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađivanju uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo povjerenja od 95%. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksini slični PCB-i, tada se suma procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a koristi za sumu PCDD/PCDF-a i dioksina sličnih PCB-a.

8.1.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CCa datih u tački 2.2. poglavlja I ovog dijela B ovog priloga, tada se navodi i taj parametar.

8.1.6. Rezultati se iskazuju u istim mjernim jedinicama i zaokružuju barem na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine u skladu sa propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje.

8.2. Bioanalitičke skrining metode

8.2.1. Rezultat skrining metode izražava se kao usklađen ili se za njega sumnja da je neusklađen („sumnjiv”).

8.2.2. Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-e i/ili dioksini slične PCB-e može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).

8.2.3. Za uzorke sa odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su „ispod granice izvještavanja”.

8.2.4. Za svaku vrstu matriksa uzorka u izvještaju se navodi maksimalna dozvoljena količina ili nivo potreban za pokretanje postupka na kojoj se procjena zasniva.

8.2.5. U izvještaju se navodi vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.

8.2.6. U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-a, dioksinu sličnih PCB-a
8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usklađeni, u izvještaj treba uključivati napomenu o postupku koji treba preduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-a i zbir PCDD/PCDF-a i dioksinu sličnih PCB-a u tim uzorcima sa povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

Dio IV

Priprema uzorka koji se koristi u kontrolama količina PCB-a koji nijesu slični dioksinu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Područje primjene

Analiza hrane za životinje za kontrolu nivoa polihlorovanih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-a koji nisu slični dioksinu) vrši se na sljedeći način.

2. Metode detekcije koje se koriste

Gasna hromatografija/elektron apsorbujući detektor (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrda traženih analita

3.1. Relativno retenciono vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25\%$).

3.2. Gasno hromatografska separacija svih šest indikatorskih PCB-a (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih materija, posebno ko-eluiranih PCB-a, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusklađenost se mora potvrditi.

[Kongeneri za koje je često ustanovljeno da ko-eluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših hlorovanih kongenera.]

3.3. Zahtjevi za tehnike GC-MS

Monitoring najmanje:

(a) dva specifična jona za HRMS;

(b) dva specifična jona s $m/z > 200$ ili tri specifična jona s $m/z > 100$ za LRMS;

(c) 1 prekursor jon i 2 jona produkta za MS-MS.

Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracioni standard za ciljni jon (jon s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrdnih jona:

Relativni odgovor potvrdnih jona u odnosu na ciljni jon	GC-EI-MS (relativna devijacija)	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ (relativna devijacija)
>50 %	$\pm 10 \%$	$\pm 20 \%$
>20 % do 50 %	$\pm 15 \%$	$\pm 25 \%$
>10 % do 20 %	$\pm 20 \%$	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$ (*)	$\pm 50 \%$ (*)

(*) Zadovoljavajući broj masenih fragmenata sa relativnim intenzitetom >10% mora biti dostupan, zato nije preporučljiva. Utotreba potvrdnih jona sa relativnim odgovorom manjim od 10% u poređenju sa ciljnim jonom

3.4. Zahtjevi za tehnike GC-ECD

Potvrda rezultata koji prelaze dozvoljena odstupanja sa dvije GC kolone sa stacionarnim fazama različite polarnosti.

4. Prikazivanje izvođenja metode

Performanse metode se mogu validovati u obim maksimalno dozvoljene količine (0,5 do 2 puta više od maksimalno dozvoljene količine) sa prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize.

5. Granica kvantifikacije

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30% nivoa kontaminacije što odgovara maksimalno dozvoljenoj količini⁹.

6. Kontrola kvaliteta

Redovne slijepe probe, analize uzoraka sa dodatkom (spajkom), analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, učešće u međulaboratorijskim testovima sa različitim matriksima uzoraka.

7. Kontrola iskorišćenja (recovery-ja)

7.1. Korišćenje pogodnih internih standarda sa fizičko-hemijskim svojstvima koji odgovaraju analitima od interesa

7.2. Dodavanje internih standarda:

Dodavanje proizvoda (prije ekstrakcije i postupka čišćenja).

7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-a označenih izotopima:

(a) korekcija rezultata za iskorišćenje internih standarda;

(b) iskorišćenje izotopski označenih internih standarda je između 50 i 120%;

(c) manje ili veće iskorišćenje je prihvatljivo za pojedinačne kongenere koji učestvuju sa manje od 10% u ukupnoj sumi

7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih internih standarda ili se koriste drugi interni standardi:

(a) kontrola iskorišćenja internih standarda za svaki uzorak;

(b) prihvatljivo iskorišćenje internih standarda između 60 i 120%;

(c) korekcija rezultata u pogledu iskorišćenja internih standarda.

7.5. Iskorišćenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka sa dodatkom (spajkovanih uzoraka) ili kontrolnih uzoraka sa koncentracijama u rasponu maksimalno dozvoljene količine. Prihvatljivo iskorišćenje za te kongenere je između 70 i 120 %.

8. Zahtjevi za laboratorije

Laboratorije treba da su akreditovane u skladu sa zakonom, sa zahtjevima ISO vodiča br. 58 (radi obezbjeđenja analitičkog kvaliteta) i u skladu sa standardom MEST EN ISO/IEC 17025:2011 i u skladu sa propisom kojim je uređena bezbjednost hrane.

9. Karakteristike izvodljivosti: kriterijum za sumu šest indikatorskih PCB-a kod maksimalno dozvoljene količine

Istinitost	-30 to +30%
Srednja preciznost (RSD%)	$\leq 2\%$
Razlika između izračunavanja gornje i donje granice	$\leq 20\%$

10. Izvještaj o rezultatima

10.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dozvoljava, analitički rezultati moraju sadržati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definisati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaju uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

10.2. U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-a i masti.

10.3. Iskorišćenja pojedinih internih standarda moraju biti navedena u slučaju da su van raspona datog u tački 7., u slučaju da je dobijeni rezultat veći od maksimalno dozvoljenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.

10.4. S obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, taj je parametar takođe potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo povjerenja od 95%.

10.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CCa u skladu sa tačkom 2.1. Dio I ovog priloga, tada se mora navesti i taj parametar.

10.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti najmanje na jednak broj decimalnih mjesta kao maksimalno dozvoljene količine, u skladu sa propisom o maksimalno dozvoljenim količinama nepoželjnih materija u hrani za životinje.

⁹ Izrazito se preporučuje niži doprinos nivoa kontaminenata u slijepoj probi od nivoa kontaminenata u uzorku. Laboratorija je odgovorna kontrolisati varijaciju nivoa vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.

METODE ZA ODREĐIVANJE SASTOJAKA HRANE ZA ŽIVOTINJE

1. Cilj i područje primjene

Određivanje sastojaka životinjskog porijekla u hrani za životinje vrši se u skladu sa sljedećim metodama.

Svjetlosna mikroskopija ili lančana reakcija polimerazom (PCR) omogućavaju otkrivanje prisutnosti sastojaka životinjskog porijekla u hranivima i smješama za ishranu životinja. s tim da ne omogućavaju izračunavanje količine takvih sastojaka u hranivima i smješama za ishranu životinja.

Granicu detekcije ispod 0,1 % (m/m).

PCR metoda omogućuje određivanje taksonomske grupe sastojaka životinjskog porijekla prisutnih u hranivima i smješama za ishranu životinja.

Zavisno od vrste hrane za životinje koja se ispituje, ove metode mogu se koristiti u okviru jedinstvenog operativnog protokola samostalno ili zajedno u skladu sa standardnim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavila referentna laboratorija za životinjske bjelancevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavila na svojoj internet stranici¹.

2. METODE**2.1. Svjetlosna mikroskopija****2.1.1. Princip**

Sastojci životinjskog porijekla koji mogu biti prisutni u hranivima i smješama za ishranu životinja koje se šalju na analizu identifikuju se na osnovu tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika kao što su mišićna vlakna i ostali dijelovi mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, krv, perje, ljuske jaja, riblje kosti i ljuske.

2.1.2. Reagensi i oprema**2.1.2.1. Reagensi**

2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentrovanje

2.1.2.1.1.1. Tetrahloretilen (gustina 1,62)

2.1.2.1.2. Reagens za bojenje

2.1.2.1.2.1. Rastvor alizarin crveno (rastvori se 2,5 ml 1M hlorovodonične kiseline u 100 ml vode i tom se rastvoru doda 200 mg alizarin crvenog)

2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata

2.1.2.1.3.1. Baza (NaOH 2,5 % w/v ili KOH 2,5 % w/v)

2.1.2.1.3.2. Glicerol (nerazblažen, viskoznost: 1 490 cP)

2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (viskoznost: 1 200 cP) ili smola sa istim svojstvima za pripremu trajnih preparata

2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata sa osobinama bojenja

2.1.2.1.4.1. Lugolov rastvor (rastvori se 2 g kalijum jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda)

2.1.2.1.4.2. Cistinski reagens (2 g olovo acetata, 10 g NaOH/100 ml vode)

2.1.2.1.4.3. Fehlingov reagens (pripremi se prije upotrebe od jednakih dijelova (1/1) osnovnih rastvora A i B. Rastvor A: 6,9 g bakar (II) sulfata pentahidrata rastvori se u 100 ml vode. Rastvor B: 34,6 g kalijum-natrijum tartarata tetrahidrata i 12 g NaOH rastvori se u 100 ml vode)

2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin/vodonik peroksid (rastvori se 1 g 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml glacijalne sirćetne kiseline i 150 ml vode. Prije upotrebe izmiješaju se 4 dijela ovog TMB rastvora s jednim dijelom 3 % vodonik peroksida)

2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje

2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (tehnički čist)

2.1.2.1.5.2. Aceton (tehnički čist)

2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje

2.1.2.1.6.1. Komercijalni rastvor natrijum hipohlorita (9 – 14 % aktivnog hlora)

2.1.2.2. Oprema

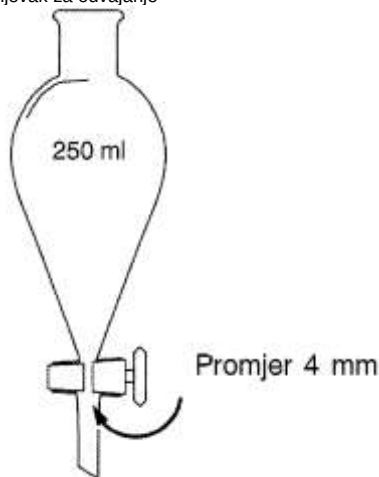
2.1.2.2.1. Analitička vaga sa preciznošću od 0,001 g

2.1.2.2.2. Pribor za mljevenje: mlin ili avan

2.1.2.2.3. Sito sa mrežicom kvadratnih otvora širine 0,25 mm i 1 mm

2.1.2.2.4. Konusni stakleni lijevak za odvajanje zapremine 250 ml sa teflonskom slavinom ili slavinom od brušenog stakla. Promjer otvora slavine mora biti ≥ 4 mm. Alternativno, umjesto toga se može upotrijebiti čaša s konusnim dnom za taloženje pod uslovom da je laboratorija dokazala da su granice detekcije iste onima kada se koristi konusni stakleni lijevak za odvajanje.

Lijevak za odvajanje



2.1.2.2.5. Stereomikroskop koji obuhvata najmanje 6,5 × do 40 × finalni obim povećanja

2.1.2.2.6. Sastavljeni mikroskop koji obuhvata najmanje 100× do 400× finalni obim povećanja sa poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizovano svjetlo i diferencijalni interferentni kontrast

2.1.2.2.7. Standardno laboratorijsko posuđe od stakla

2.1.2.2.8. Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska pločica, pločica s udubljenjem, pokrovna pločica (20 × 20 mm), pinceta, fina kašika

2.1.3. Uzimanje uzoraka i priprema uzorka**2.1.3.1. Uzimanje uzoraka**

Koristi se reprezentativan uzorak.

2.1.3.2. Mjere predostrožnosti

Kako bi se spriječila ukrštena kontaminacija u laboratoriji, svu laboratorijsku opremu za višekratnu upotrebu potrebno je pažljivo očistiti prije upotrebe. Dijelove lijevka za odvajanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Dijelove lijevka za odvajanje i posuđe od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u mašini za posuđe. Sita se moraju očistiti četkom sa tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporučuje se završno čišćenje sita acetonom i vazduhom iz kompresora nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

¹ <http://eurl.craw.eu/>

2.1.3.3. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.3.1. Sušenje uzorka: uzorci sa sadržajem vlage >14 % moraju se osušiti prije rukovanja.

2.1.3.3.2. Prethodno prosijavanje uzorka: preporučuje se da se hrana u peletima i zrnju prethodno prosije na 1mm, a zatim se dobijene frakcije analiziraju kao odvojeni uzorci.

2.1.3.3.3. Razdvajanje uzorka u poduzroke i mljevenje: barem 50 g uzorka se razdvoji na poduzorke za analizu koji se zatim melju.

2.1.3.3.4. Ekstrakcija i priprema taloga: prenese se dio od 10g (sa preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odvajanje ili čašu sa konusnim dnom za taloženje i doda se 50ml tetrahloretilena. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog porijekla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10% taloga. Mješavinu je potrebno snažno promućkati tokom najmanje 30s i mora se oprezno dodati najmanje još 50ml tetrahloretilena kako bi se isprali unutrašnji zidovi lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobijena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem slavine.

Ako se koristi čaša sa konusnim dnom za taloženje, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prijanjajuće čestice uz zidove čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu sa najmanje 10 ml čistog tetrahloretilena. Mješavinu je potrebno ostaviti da stoji tokom 3 minuta i zatim ponovo promiješati tokom 15 sekundi, sve čestice koje prijanjaju uz zidove čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu sa najmanje 10 ml čistog tetrahloretilena. Tako dobijena mješavina se ostavi stajati najmanje 5 minuta, zatim se tečna frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se ni malo taloga ne izgubi.

Talog se osuši i zatim izmjeri (sa preciznošću od 0,001 g). Ako više od 5 % taloga sadrži čestice >0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.5. Ekstrakcija i priprema flotata: nakon dobijanja taloga gore opisanom metodom, u lijevku za odvajanje moraju ostati dvije faze: tečna koja se sastoji od tetrahloretilena i čvrsta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta čvrsta faza je flotat koji se izoluje tako da se tetrahloretilen u cijelosti odlije iz lijevka otvaranjem slavine. Okretanjem lijevka za odvajanje, flotat se prenese u veliku Petrijevju šolju i suši na vazduhu u digestoru. Ako se više od 5 % flotata sastoji od čestica >0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.6. Priprema sirovog materijala: pripremi se dio od najmanje 5 g samljevenog poduzorka. Ako se više od 5 % materijala sastoji od čestica >0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.4. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja

Potrebno je slijediti sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti ili ulja:

- ako je mast u čvrstom stanju, zagrijava se u pećnici, dok ne postane tečna,
- koristeći pipetu prenese se 40 ml masti ili ulja sa dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje,
- centrifugira se 10 minuta na 4 000 obr./min,
- ako se mast stvrdnula nakon centrifugiranja, zagrijava se u pećnici dok ne postane tečna,
- ponovo se centrifugira 5 minuta na 4 000 obr./min,
- malom kašikom ili spatulom se prenese polovina dekantovane nečistoće na mikroskopsku pločicu za identifikaciju. Kao sredstvo za pripremu preparata preporučuje se glicerol,
- preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u tački 2.1.3.3.

2.1.3.5. Upotreba reagensa za bojanje

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog porijekla, subjekt može koristiti reagense za bojanje tokom pripreme uzorka u skladu sa smjernicama koje je izdao EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

Ako se koristi rastvor Alizarin crveno za bojanje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

- osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere sa približno 5 ml etanola (svaki put se koristi miješalica (vortex) tokom 30 s, a rastvor se ostavi stajati približno 1 minut i 30 s i zatim odlije),
- talog se izbije dodavanjem najmanje 1 ml rastvora natrijum hipohlorita. Reakcija se razvija 10 minuta. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi da stoji 2 - 3 minuta, a voda i suspendovane čestice se pažljivo odliju,
- talog se dvaput ispere sa 10 ml vode (koristi se miješalica (vortex) 30 s, ostavi da se istaloži i svaki put se odlije voda),
- doda se 2 - 10 kapi rastvora Alizarin crveno i smješa se promućka na miješalici. Trajanje reakcije je 30 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere sa približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki se put koristi miješalica 30 s, a rastvor se ostavi da stoji približno 1 minut i zatim odlije),
- obojeni talog se osuši.

2.1.4. Mikroskopski pregled

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat se priprema od taloga i, zavisno od izbora operatera, od flotata ili sirovog materijala. Ako se tokom pripreme preparata koristilo prosijavanje, pripremaju se obje dobijene frakcije (fina i gruba). Ogledni dijelovi frakcija nanoseni na pločice reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se obezbjedilo sprovođenje čitavog ispitivanja u skladu sa tačkom 2.1.4.2. ovog dijela.

Mikroskopski preparati se pripremaju sa odgovarajućim sredstvom za pripremu preparata u skladu sa SOP-om koji je odredio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim pločicama.

2.1.4.2. Protokoli pregleda za određivanje životinjskih čestica u hranivima i smješama za ishranu životinja

Pripremljeni mikroskopski preparati se pregledaju u skladu s protokolima pregleda prikazanim u dijagramu 1 za krmne smješe i krmiva osim za čisto riblje brašno ili u dijagramu 2 za čisto riblje brašno.

Mikroskopski pregledi će se sprovesti koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i zavisno o izbora operatera bilo na flotatu ili na sirovom materijalu. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat se u potpunosti pregleda pod različitim povećanjima.

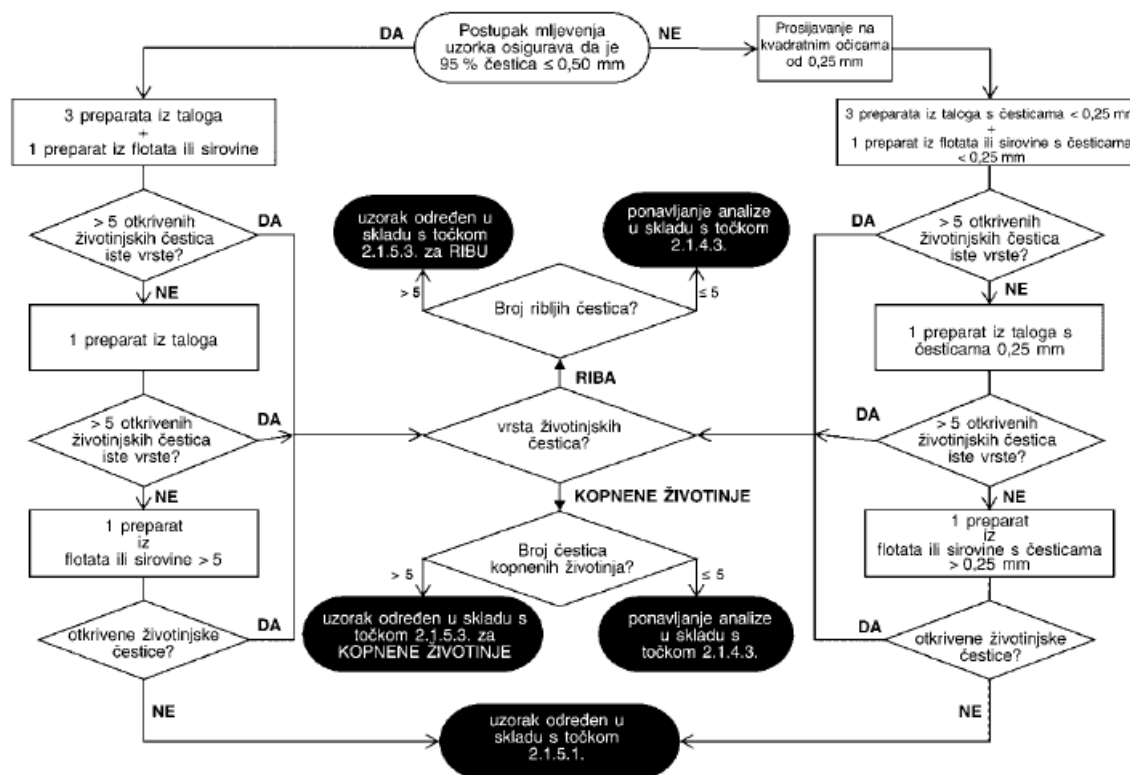
Minimalni broj preparata koji će se pregledati tokom svakog koraka protokola pregleda mora se striktno poštovati, osim ako nije moguće korišćenjem čitavog materijala iz frakcije postići utvrđeni broj preparata.

Pri svakom određivanju pregleda se najviše šest preparata.

Za lakšu identifikaciju vrste i porijekla čestica, operater može koristiti pomoćne alate kao što su sistemi za pomoć pri odlučivanju, slikovne knjižnice i referentne uzorke.

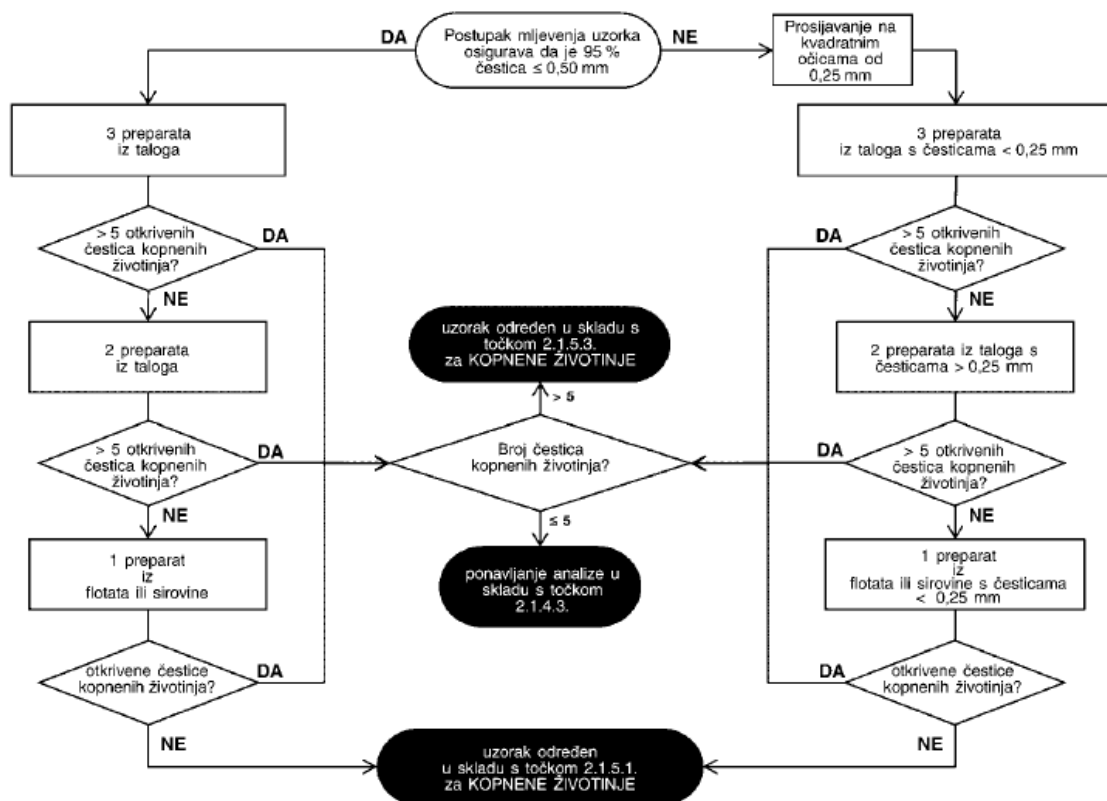
Dijagram 1

Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i krmivima osim ribljeg brašna



Dijagram 2

Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u ribljem brašnu



2.1.4.3. Broj određivanja

Ako nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu sa protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2 nije otkrivena ni jedna životinjska čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), nije potrebno dodatno određivanje, a o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korišćenjem terminologije iz tačke 2.1.5.1.

Ako nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu s protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe) iznosi od 1 do 5, sprovodi se drugo određivanje na novom poduzorku od 50 g. Ako nakon drugog određivanja ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla iznosi od 0 do 5, o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korišćenjem terminologije iz tačke 2.1.5.2. ovog dijela, ili se sprovodi treće određivanje na novom poduzorku od 50 g. Ipak, ako je nakon prvog i drugog određivanja zbir otkrivenih čestica datog porijekla veći od 15, dodatno određivanje nije potrebno, a o rezultatima je potrebno direktno izvijestiti korišćenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3. ovog dijela. Ako je nakon trećeg određivanja zbir otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla veći od 15, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korišćenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3. ovog dijela, a izvještaj o izvršenoj analizi sačinjava se u skladu sa tačkom 2.1.5.3. ovog dijela.

Ako je nakon prvog određivanja sprovedenog u skladu sa protokolima pregleda propisanim u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, otkriveno više od 5 životinjskih čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), a izvještaj o izvršenoj analizi sačinjava se u skladu sa tačkom 2.1.5.3. ovog dijela.

2.1.5. Prikazivanje rezultata

Pri izveštavanju o rezultatima, laboratorija mora navesti na kojoj vrsti materijala je sprovedena analiza (talog, flotat ili sirovi materijal) i koliko je određivanja sprovedeno.

Laboratorijski izvještaj mora sadržati najmanje informacije o prisutnosti sastojaka porijekla od kopnenih životinja ili ribe.

O različitim slučajevima se izveštava na sledeće načine.

2.1.5.1. Nije otkrivena nijedna čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijekla od kopnenih životinja,
- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijekla od ribe.

2.1.5.2. Prosječno je otkriveno između jedne i pet životinjskih čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od pet čestica porijekla od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identifikovane kao kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi. Ovaj nizak nivo prisutnosti, koji je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

Ili, ako je primjereno:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od pet čestica porijekla od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolith, škрге. Ovaj nizak nivo prisutnosti, koji je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvještaju mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak zagađenja iz okolne sredine.

2.1.5.3. Prosječno je otkriveno više od pet životinjskih čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, prosječno je otkriveno više od pet čestica porijekla od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identifikovane kao kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogovi.

Ili, ako je primjereno:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svetlosnim mikroskopom, prosječno je otkriveno više od pet čestica porijekla od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identifikovane kao riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolith, škрге.

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvještaju mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolnog zagađenja.

2.2. PCR

2.2.1. Princip

Fragmenti dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) životinjskog porijekla koji mogu biti prisutni u hranivima i smjesama za ishranu životinja otkrivaju se tehnikom genskog umnožavanja putem PCR-a koja cilja DNK sekvence značajne za vrstu.

PCR metoda zahtijeva najprije ekstrakciju DNK-a. Umnožavanje se vrši kasnije na dobijenom DNK ekstraktu kako bi se otkrila ciljana životinjska vrsta.

2.2.2. Reagensi i oprema

2.2.2.1. Reagensi

2.2.2.1.1. Reagensi za ekstrakciju DNK-a

Upotrebljavaju se samo reagensi koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.2.1.2. Reagensi za umnožavanje genskog materijala

2.2.2.1.2.1. "Primers" i sonde

Upotrebljavaju se samo primeri i sonde sa sekvencama oligonukleotida koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici².

2.2.2.1.2.2. Glavna mješavina (Master mix)

Upotrebljavaju se samo rastvori glavne mješavine koje ne sadrže reagente koji bi mogli prouzrokovati lažne rezultate zbog prisutnosti životinjskog DNK-a³.

2.2.2.1.2.3. Reagensi za dekontaminaciju

2.2.2.1.2.3.1. Rastvor hlorovodonične kiseline (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Izbjeljivač (rastvor natrijum hipohlorita s 0,15 % aktivnog hlora)

2.2.2.1.2.3.3. Ne korozivni reagensi za dekontaminaciju skupih uređaja kao što su analitičke vage (npr. DNA Erase™ proizvođača MP Biomedicals)

2.2.2.2. Oprema

2.2.2.2.1. Analitička vaga sa preciznošću od 0,001 g

2.2.2.2.2. Pribor za mljevenje

2.2.2.2.3. Uređaj za PCR (Thermocycler) koji omogućava PCR u stvarnom vremenu

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga za mikropruvete

2.2.2.2.5. Komplet mikropipeta koje omogućavaju pipetiranje od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardna plastična oprema za mikrobiologiju: mikropruvete za mikrocentrifugu, plastični nastavci s filterima za mikropipete, odgovarajuće pločice za uređaj za PCR (thermocycler).

2.2.2.2.7. Frižideri za skladištenje uzoraka i reagensa

2.2.3. Uzimanje uzoraka i priprema uzorka

2.2.3.1. Uzimanje uzoraka

Reprezentativan uzorak je uzorak uzet u skladu sa odredbama Priloga I ovog pravilnika.

2.2.3.2. Priprema uzorka

Pri pripremi laboratorijskih uzoraka do ekstrakcije DNK-a vrši se u skladu sa zahtjevima datim u Prilogu II ovog pravilnika. Od najmanje 50 g uzorka se napravi poduzorak za analizu, koji se zatim samelje.

Priprema uzorka mora se sprovesti u drugom prostoru od onih koji se koriste za ekstrakciju DNK-a i umnožavanje genskog materijala u skladu sa standardom ISO 24276.

Pripreme se dva testna uzorka od najmanje 100 mg svaki.

2.2.4. Ekstrakcija DNK-a

Ekstrakcija DNK-a sprovodi se na svakom pripremljenom testnom uzorku koristeći SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

Za svaku seriju ekstrakcije DNK-a pripremaju se dva kontrolna uzorka kako je opisano u ISO standardu 24276:

- slijepi kontrolni uzorak ekstrakcije,
- pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a.

2.2.5. Umnožavanje genskog materijala

Genski materijal se umnožava koristeći metode odobrene za svaku vrstu koja zahtijeva identifikaciju. Te metode su propisane u SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici. Svaki ekstrakt DNK-a se analizira u najmanje dva različita razblaženja kako bi se ocijenila inhibicija.

Za svaku ciljanu vrstu pripremaju se dva kontrolna uzorka koja se umnožavaju kako je opisano u ISO standardu 24276:

- pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR,
- kontrolni uzorak reagensa za umnožavanje (zove se također kontrolni uzorak bez matrice) se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.

2.2.6. Tumačenje i prikaz rezultata

U izvještaju o rezultatima laboratorija mora navesti najmanje masu upotrijebljenog testnog uzorka, korišćene tehnike za ekstrakciju, broj sprovedenih određivanja i granicu detekcije metode.

Rezultati se ne smiju tumačiti i saopštavati ako pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a i pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om ne omogućavaju određivanje ciljane vrste pri analizi, dok je rezultat kontrolnog uzorka reagensa za umnožavanje negativan.

U slučaju da rezultati dva testna uzorka nisu u skladu, potrebno je ponoviti barem korak genskog umnožavanja. Ako laboratorija sumnja da razlog za neusklađenost mogu biti ekstrakti DNK-a, sprovodi se nova ekstrakcija DNK-a i umnožavanje genskog materijala prije tumačenja rezultata.

Konačni prikaz rezultata mora se zasnivati na integraciji i tumačenju rezultata dva testna uzorka u skladu sa SOP-om koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.6.1. Negativni rezultat

O negativnom rezultatu se izvještava na sledeći način:

U dostavljenom uzorku nije bio otkriven ni jedan DNK iz X (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

2.2.6.2. Pozitivni rezultat

O pozitivnom rezultatu se izvještava na sledeći način:

DNK iz X je otkriven u dostavljenom uzorku (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

² Popis ovih primera i sonde za svaku ciljanu životinjsku vrstu dostupan je na internet stranici EURL-AP-a.

³ Primeri glavnih mješavina koje su funkcionalne dostupni su na internet stranici EURL-AP-a.

METODA ZA ODREĐIVANJE ENERGETSKE VRIJEDNOSTI HRANE

1. Metoda izračunavanja i prikaza energetske vrijednosti

Energetska vrijednost hrane za živinu izražava se u procentima sastojaka hrane za životinje. Energetska vrijednost iskazuje se u megadžulima (MJ) metaboličke energije (ME), sa korekcijama za azot, na kilogram smješe:

$MJ/kg ME = 0,1551 \times \% \text{ sirovih proteina} + 0,3431 \times \% \text{ sirovih masti} + 0,1669 \times \% \text{ skroba} + 0,1301 \times \% \text{ ukupnog šećera (iskazanog kao saharoza)}$.

2. Odstupanja za vrijednosti

Ako se službenom kontrolom otkrije razlika (povećana ili smanjena energetska vrijednost hrane za životinje) između rezultata pregleda i energetske vrijednosti koja je navedena na etiketi ili oznaci koja prati hranu za životinje, dozvoljeno je najmanje odstupanje od 0,4 MJ/kg ME.

3. Prikaz rezultata

Rezultat ispitivanja energetske vrijednosti primjenom formule iz tačke 1 ovog priloga iskazuju se jednom decimalom.

4. Metode uzimanja uzoraka i metode analize

Uzimanje uzoraka krmnih smješa i određivanje udjela analitičkih sastojaka navedenih u metodi izračunavanja vrši se u skladu sa propisanim metodama:

- za određivanje udjela sirove masti: postupak B metode za određivanje sirovih ulja i masti iz dijela 5 Priloga III ovog pravilnika,
- za određivanje udjela skroba: polarimetrijska metoda iz dijela 8 Priloga III ovog pravilnika.

METODE KONTROLE DODATAKA HRANI ZA ŽIVOTINJE

Utvrđivanje prisutnosti dodataka hrani za životinje u skladu sa propisom kojim se uređuju dodaci hrani za životinje kao potvrđne metode vrši se prema sljedećoj metodi.

Dio I

ODREĐIVANJE METIL BENZOKVATA

7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-hinolon

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa metil benzokvata u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granica kvantifikacije je 1 mg/kg.

2. Princip

Metil benzokvat se iz uzorka ekstrahuje rastvorom metanol metansulfonske kiseline. Ekstrakt se prečisti dihlormetanom, jonsko-izmjenjivačkom hromatografijom i zatim ponovo dihlormetanom. Udio metil benzokvata određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi.

3.1. Dihlormetan.

3.2. Metanol, za HPLC.

3.3. Mobilna faza HPLC-a.

Smješa metanola (tačka 3.2.) i vode (za HPLC) 75 + 25 (v + v).

Filtrira se kroz filter 0,22 µm (tačka 4.5.) i rastvor se degazira (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu).

3.4. Rastvor metansulfonske kiseline, c = 2 %.

Metanolom se razblaži 20,0 ml metansulfonske kiseline do 1 000 ml (tačka 3.2.).

3.5. Rastvor hlorigovodnične kiseline, c = 10 %.

Vodom se razblaži 100 ml hlorigovodnične kiseline (p₂₀ 1,18 g/ml) do 1 000 ml.

3.6. Katjionska izmjenjivačka smola Amberlite CG-120 (Na), 100 do 200 mesh.

Smola se prije upotrebe tretira. Suspenduje se 100 g smole u 500 ml rastvora hlorigovodnične kiseline (tačka 3.5.) i uz stalno miješanje zagrijava na vreloj ploči do ključanja. Ohladi se i kisjelina odlije. Filtrira se kroz papirni filter pod vakuumom. Smola se dvaput ispere s 500 ml vode, zatim sa 250 ml metanola (tačka 3.2.). Ispere se još jednom sa 250 ml metanola i osuši produbljavanjem vazduha kroz filtriranu pogaču. Suva se smola čuva u zatvorenoj boci.

3.7. Standardna materija: čisti metil benzokvat (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-kinolon)

3.7.1. Osnovni rastvor standarda metil benzokvata, 500 µg/ml

Izmjeri se 50 mg standardne materije (tačka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg, rastvori u rastvoru metansulfonske kiseline (tačka 3.4.) u sudu zapremine 100 ml, dopuni do oznake i promiješa.

3.7.2. Intermedijarni rastvor standarda metil benzokvata, 50 µg/ml

Prenese se 5,0 ml osnovnog rastvora standarda metil benzokvata (tačka 3.7.1.) u sud zapremine 50 ml, dopuni do oznake metanolom (tačka 3.2.) i promiješa.

3.7.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 25 ml prenese se 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml intermedijarnog rastvora standarda metil benzokvata (tačka 3.7.2). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (tačka 3.3.) i promiješa. Koncentracija metil benzokvata u tim rastvorima iznosi 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 µg/ml. Prije upotrebe ovi se rastvori moraju svježe pripremiti.

4. Oprema

4.1. Laboratorijski šejker.

4.2. Rotacioni vakuum uparivač.

4.3. Staklena kolona (250 mm × 15 mm) sa slavinom i rezervoarom kapaciteta približno 200 ml.

4.4. HPLC sa ultraljubičastim detektorom (UV) sa mogućnošću promjene talasne dužine, ili detektorom sa nizom dioda (DAD).

4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju: 300 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili ekvivalentna.

4.5. Membranski filteri, 0,22 µm.

4.6. Membranski filteri, 0,45 µm.

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje provjerava se da nisu prisutni ni metil benzokvat niti interferentne materije.

5.1.2. Test iskorišćenja sprovodi se analizom slijepe probe hrane za životinje kojoj se doda količina metil benzokvata slična količini u uzorku. Za dobijanje koncentracije od 15 mg/kg u 20 g slijepe probe hrane za životinje doda se 600 µl osnovnog rastvora standarda (tačka 3.7.1.), promiješa i prička deset minuta prije početka postupka ekstrakcije (tačka 5.2.).

Napomena: Kod ove metode slijepe proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smije pronaći metil benzokvat.

5.2. Ekstrakcija

Izmjeri se približno 20 g pripremljenog uzorka sa preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 250 ml. Doda se 100,0 ml rastvora metansulfonske kiseline (tačka 3.4.) i mehanički protresa (tačka 4.1.) 30 minuta. Rastvor se filtrira kroz papirni filter, a filtrat se spremi za postupak razdvajanja tečnost-tečnost (tačka 5.3.).

5.3. Razdvajanje tečnost-tečnost

U lijevak za odvajanje zapremine 500 ml u kojem se nalazi 100 ml rastvora hlороводиčne kiseline (tačka 3.5.) prenese se 25,0 ml filtrata dobijenog u postupku iz tačke 5.2. U lijevak se doda 100 ml dihlormetana (tačka 3.1.) i mučka jedan minut. Pričeka se da se slojevi razdvoje pa se donji (dihlormetanski) sloj odlije u tikvicu s okruglim dnom zapremine 500 ml. Ponovi se ekstrakcija vodene faze sa 40 ml dihlormetana, a dobijeni se ekstrakti pomiješaju s prvim ekstraktom u tikvici s okruglim dnom. Ekstrakt dihlormetana se upari do suva u rotacionom uparivaču (tačka 4.2.) pri sniženom pritisku, na 40 °C. Ostatak se rastvori u 20 – 25 ml metanola (tačka 3.2.), tikvica se začepe i sav ekstrakt spremi za jonsko-izmjenjivačku hromatografiju (tačka 5.4.).

5.4. Jonsko-izmjenjivačka hromatografija

5.4.1. Priprema katjonske izmjenjivačke kolone

U donji dio staklene kolone postavi se mali čep od staklene vune (tačka 4.3.). Pripremi se suspenzija sa 5,0 g obrađene katjonske izmjenjivačke smole (tačka 3.6.) i 50 ml hlороводиčne kiseline (tačka 3.5.), ulije u staklenu kolonu i pričeka da se staloži. Ukloni se višak kiseline do visine neposredno iznad površine smole, zatim se kolona ispere vodom do neutralne reakcije eluata na lakmusov papir. U kolonu se prenese 50 ml metanola (tačka 3.2.) i ostavi da istekne do površine smole.

5.4.2. Kolonska hromatografija

Dobijeni se ekstrakt (tačka 5.3.) pipetom pažljivo prenese u kolonu. Tikvica sa okruglim dnom se dvaput ispere sa 5 – 10 ml metanola (tačka 3.2.), a isprane tečnosti prenesu se u kolonu. Ekstrakt se ulije do površine smole i kolona ispere sa 50 ml metanola, pri čemu brzina protoka ne smije preći 5 ml u minuti. Eluat se odbaci. Metil benzokvat se iz kolone eluira sa 150 ml rastvora metansulfonske kiseline (tačka 3.4.), a eluat iz kolone prikupe u konusnu tikvicu zapremine 250 ml.

5.5. Razdvajanje tečnost-tečnost

Dobijeni eluat (tačka 5.4.2.) prenese se u lijevak za razdvajanje zapremine 1 l. Konusna tikvica se ispere sa 5 – 10 ml metanola (tačka 3.2.), a isprana tečnost pomiješa sa sadržajem u lijevku za razdvajanje. Doda se 300 ml rastvora hlороводиčne kiseline (tačka 3.5.) i 130 ml dihlormetana (tačka 3.1.). Mučka se 1 minut i ostavi da se faze razdvoje. Donji (dihlormetanski) sloj se odlije u tikvicu s okruglim dnom zapremine 500 ml. Ekstrakcija vodene faze se ponovi dvaput sa 70 ml dihlormetana, a oba se ekstrakta pomiješaju s prvim u tikvici s okruglim dnom.

Ekstrakt dihlormetana se upari do suva u rotacionom vakuum uparivaču (tačka 4.2.) pod sniženim pritiskom na 40 °C. Ostatak u tikvici se rastvori u približno 5 ml metanola (tačka 3.2.), a rastvor prenese u sud zapremine 10 ml. Tikvica s okruglim dnom se dvaput ispere sa 1 – 2 ml metanola, a isprane tečnosti prenesu u sud. Dopuni se metanolom do oznake i promiješa. Alikvotni dio se filtrira kroz membranski filter (tačka 4.6.). Taj se rastvor čuva za određivanje putem HPLC-a (tačka 5.6.).

5.6. Određivanje na HPLC-u

5.6.1. Parametri

Za određivanje HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati:

- kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.4.1.),
- mobilna faza za HPLC-a: smješa metanola i vode (tačka 3.3.),
- brzina protoka: 1 – 1,5 ml/min,
- talasna dužina detekcije: 265 nm,
- zapremina injektiranja: 20 – 50 µl.

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektiranjem kalibracionog rastvora koncentracije 4,0 µg/ml (tačka 3.7.3.) sve dok se ne dobiju konstantne visine ili površine pikova i konstantna retenciona vremena.

5.6.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.7.3.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.6.3. Rastvor uzorka

Više puta se ubrizga ekstrakt uzorka (tačka 5.5.), pri čemu se koriste jednaka zapremina kao za kalibracione rastvore, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova metil benzokvata.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti pikova (površina) metil benzokvata iz kalibracione krive (tačka 5.6.2.).

Udio metil benzokvata (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times 40/m$$

pri čemu je:

c = koncentracija metil benzokvata u rastvoru uzorka u µg/ml.

m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojima se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3.) koncentracije 10 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

Ekstraktu uzorka se doda odgovarajuća količina intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.7.2.). Količina dodatog metil benzokvata mora biti slična procijenjenoj količini metil benzokvata u ekstraktu uzorka.

Može se povećati samo visina pika metil benzokvata, uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika na polovini njegove najviše visine mora biti unutar 10% vrijednosti prvobitne širine.

7.1.2. Detekcija s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sljedećim mjerilima:

(a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pika hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;

(b) između 220 i 350 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita;

(c) između 220 i 350 nm, spektri krive rasta, najviše tačke pika i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći: 10 % najvišeg rezultata za udio metil benzokvata između 4 i 20 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Sprovedena 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)	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
S _i (mg/kg)	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV _i [%]	-	6,70	4,40	6,70	5,70
S _R [mg/kg]	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Iskorišćenje [%]	-	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = nije detektovano

S_r	=	standardna devijacija ponovljivosti
CV_r	=	koeficijent varijacije ponovljivosti u %
S_R	=	standardna devijacija obnovljivosti
CV_R	=	koeficijent varijacije obnovljivosti u %.

Dio II

ODREĐIVANJE OLAKVINDOKSA

2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksid

1. Svrha i područje primjene

Određivanje nivoa olakvindoksa u hrani za životinje vrši se prema sljedećoj metodi. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje smjesom vode i metanola. Udio olakvindoksa određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) sa reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Metanol, za HPLC.
- 3.3. Voda, za HPLC.
- 3.4. Mobilna faza za HPLC.

Smjesa vode (tačka 3.3) i metanola (tačka 3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Standardna materija: čisti olakvindoks 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoil]-3-metilkinoksalin-N¹,N⁴-dioksid, E 851.

3.5.1. Osnovni rastvor standarda olakvindoksa, 250 µg/ml

Izmjeri se 50 mg olakvindoksa (tačka 3.5.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 200 ml, zatim se doda približno 190 ml vode. Sud se zatim drži 20 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.). Nakon obrade ultrazvukom, rastvor se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. sud se omota aluminijskom folijom i čuva u frižideru. Ovaj se rastvor mora svježe pripremiti svaki mjesec.

3.5.2. Intermedijarni rastvor standarda olakvindoksa, 25 µg/ml

Prenese se 10,0 ml osnovnog standardnog rastvora (tačka 3.5.1.) u sud zapremine 100 ml, dopuni mobilnom fazom (tačka 3.4.) do oznake i promiješa. Sud se omota aluminijskom folijom i čuva u frižideru. Ovaj se rastvor mora svježe pripremiti svaki dan.

3.5.3. Kalibracioni rastvor

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml intermedijarnog rastvora standarda (tačka 3.5.2.). Dopuni se mobilnom fazom (tačka 3.4.) do oznake i promiješa. Sudovi se omotaju aluminijskom folijom. Ovi rastvoru odgovaraju količini od 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 µg olakvindoksa na ml.

Ovi rastvori se moraju svježe pripremati svaki dan.

4. Oprema

- 4.1. Ultrazvučno kupatilo
- 4.2. Mehanički šejker
- 4.3. Oprema za HPLC s detektorom ultraljubičastog svjetla s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektorom s nizom dioda
- 4.3.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 250 mm × 4 mm, C₁₈, s veličinom čestica punjenja 10 µm ili jednakovrijedna
- 4.4. Membranski filteri, 0,45 µm

5. Postupak

Napomena: Olakvindoks je osjetljiv na svjetlo. Svi postupci se izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posuđu od tamnog stakla.

5.1. Opšte

5.1.1. Analizom slijepe probe hrane za životinje potvrđuje se da nisu prisutni niti olakvindoks niti interferentne materije.

5.1.2. Test iskorišćenja sprovodi se analizom slijepe probe hrane za životinje koja se obogaćuje dodavanjem količine olakvindoksa slične količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 50 mg/kg, prenese se 10,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.5.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml i rastvor upari do približno 0,5 ml. Doda se 50 g slijepe probe hrane za životinje, dobro promiješa i ostavi 10 minuta pa ponovo promiješa nekoliko puta prije prelaska na postupak ekstrakcije (tačka 5.2.).

Napomena: U sprovođenju ove metode slijepe proba hrane za životinje mora biti slična uzorku, a analizom se mora potvrditi odsutnost olakvindoksa.

5.2. Ekstrakcija

Izmjeri se približno 50 g uzorka s preciznošću od 0,01 g. Prenese se u konusnu tikvicu zapremine 1 000 ml, doda 100 ml metanola (tačka 3.1.) i tikvica 5 minuta drži u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.1.). Doda se 410 ml vode i ostavi sledećih 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Tikvica se izvadi iz ultrazvučnog kupatila, 30 minuta promućka na mješalici (tačka 4.2.) i zatim filtrira kroz nabrani filter. Prenese se 10,0 ml filtrata u sud zapremine 20 ml, dopuni vodom do oznake i promiješa. Alikvot se filtrira kroz membranski filter (tačka 4.4.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. Određivanje na HPLC-u

5.3.1. Parametri:

Sljedeći se uslovi predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Analiitička kolona (tačka 4.3.1.)	
Mobilna faza (tačka 3.4.):	smjesa vode (tačka 3.3.) i metanola (tačka 3.2.), 900 + 100 (V + V)
Brzina protoka:	1,5 – 2 ml/min
Talasna dužina detekcije:	380 nm
Zapremina za injektiranje:	20 – 100 µl

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektiranjem kalibracionog rastvora (tačka 3.5.3.) koncentracije 2,5 µg/ml sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retencionna vremena.

5.3.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.5.3.) i za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.2.), pri čemu se koriste jednake zapremine kao za kalibracijski rastvor, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova olakvindoksa.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova olakvindoksa u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.3.2.).

Udio olakvindoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = c \times 1000/m$$

pri čemu je:

- c = koncentracija olakvindoksa u ekstraktu uzorka (tačka 5.2.) u µg/ml
m = masa ispitivanog uzorka u g (tačka 5.2.).

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka (tačka 5.2.) i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.5.3.) koncentracije 5,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka (tačka 5.2.) doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.5.3.). Količina dodatog olakvindoksa mora biti slična procijenjenoj količini olakvindoksa u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika olakvindoksa uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika, na polovini maksimalne visine, mora biti unutar $\pm 10\%$ početne širine pika olakvindoksa u ekstraktu uzorka bez dodanog olakvindoksa.

7.1.2. Detekcija sa nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) Talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pikova hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora sa nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.

(b) Između 220 i 400 nm, spekter uzorka i spekter standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.

(c) Između 220 i 400 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjeno jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći 15 % najvišeg rezultata za udio olakvindoksa između 10 i 200 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Za obogaćeni slijepi uzorak hrane za životinje iskorišćenje mora iznositi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje u kojem je učestvovalo 13 laboratorija analizirano četiri uzorka hrane za prasad, uključujući jednu slijepu probu. Rezultati analize dati su u sljedećoj tabeli:

	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
Iskorišćenje %	-	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 = koeficijent varijacije ponovljivosti
CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti

9. Napomena

Iako ova metoda nije vrednovana za hranu za životinje koja sadrži više od 100 mg/kg olakvindoksa, mogu se dobiti zadovoljavajući rezultati upotrebom manje mase uzorka i/ili razblaženjem ekstrakta (tačka 5.2.) tako da se dobije koncentracija u području kalibracione krive (tačka 5.3.2.).

Dio III

ODREĐIVANJE AMPROLIUMA

1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinijum hlorid hidroklorid

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa amproliuma u hrani za životinje i premiksima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije je 1 mg/kg, a granica kvantifikacije 5 mg/kg.

2. Princip

Uzorak se ekstrahuje smjesom metanola i vode. Nakon razblaženja mobilnom fazom i membranske filtracije, udio amproliuma određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s izmjenom kationa uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, za HPLC.

3.3. Voda, za HPLC.

3.4. Rastvor natrijum dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l.

U sud zapremine 1 000 ml rastvori se u vodi (tačka 3.3.) 13,80 g natrijum dihidrogen fosfat monohidrata, dopuni vodom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.5. Rastvor natrijum perhlorata, c = 1,6 mol/l.

U sudu zapremine 1 000 ml rastvori se u vodi (tačka 3.3.) 224,74 g natrijum perhlorat monohidrata, dopuni vodom (tačka 3.3.) do oznake i promiješa.

3.6. Mobilna faza za HPLC

Smješa acetonitrila (tačka 3.2.), rastvor natrijum dihidrogen fosfata (tačka 3.4.) i rastvor natrijum perhlorata (tačka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Prije upotrebe filtrira se membranskim filterom 0,22 µm (tačka 4.3.), i degasira (npr. najmanje 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.4.)).

3.7. Standardna materija: čisti amprolium, I-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinijum hlorid hidroklorid, E 750.

3.7.1. Osnovni rastvor standarda amproliuma, 500 µg/ml

Izmjeri se 50 mg amproliuma (tačka 3.7.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 100 ml, rastvori u 80 ml metanola (tačka 3.1.) i sud se 10 minuta drži u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.4.). Nakon tretiranja u ultrazvučnom kupatilu rastvor se zagrije do sobne temperature, dopuni vodom do oznake i promiješa. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.7.2. Intermedijarni rastvor standarda amproliuma, 50 µg/ml

Pipetom se prenese 5,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.7.1.) u sud zapremine 50 ml, dopuni do oznake ekstrakcionim rastvorom (tačka 3.8.) i promiješa. Na temperaturi ≤ 4 °C rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.7.3. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 50 ml prenese se 0,5, 1,0, i 2,0 ml intermedijarnih rastvora standarda (tačka 3.7.2.). Dopuni se do oznake mobilnom fazom (tačka 3.6.) i promiješa. Ovi rastvori odgovaraju koncentraciji od 0,5, 1,0 i 2,0 µg amproliuma na ml. Ovi se rastvori moraju pripremiti svježe prije upotrebe.

3.8. Ekstrakcioni rastvor

Smješa metanola (tačka 3.1.) i vode 2 + 1 (v + v)

4. Oprema

4.1. HPLC sa injekcionim sistemom, prikladnim za injektovanje zapremina od 100 µl.

4.1.1. Kolona za tečnu hromatografiju, 125 mm × 4 mm s izmjenom katjona, punjenje Nucleosil 10 SA veličina čestica 5 ili 10 µm ili jednakovrijedno.

4.1.2. UV detektor s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektor s nizom dioda.

4.2. Membranski filter, materijal PTFE, 0,45 µm.

4.3. Membranski filear, 0,22 µm.

4.4. Ultrazvučno kupatilo.

4.5. Mehanički šejker ili magnetska mješalica.

5. Postupak

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Kod primjene testa iskorišćenja (tačka 5.1.2.) analizom slijepe probe hrane za životinje utvrđuje se da nisu prisutni niti amprolium niti interferentne materije. Slijeпа proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju pronaći amprolium niti interferentne tvari.

5.1.2. Test iskorišćenja (Recovery)

Test iskorišćenja sprovodi se analizom slijepe probe hrane za životinje u koju se dodaje količina amproliuma slična količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 100 mg/kg, prenese se 10,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.7.1.) u konusnu tikvicu zapremine 250 ml i rastvor upari 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 (tačka 5.2.).

Ako nije dostupna slijeпа probe hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se umjesto toga sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku za analizu dodaje količina amproliuma slična onoj u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodatog amproliuma, a iskorišćenje se izračunava oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Premiksi (udio amproliuma < 1 %) i hrana za životinje

Izmjeri se 5 – 40 g uzorka, zavisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,01 g, prenese u konusnu tikvicu zapremine 500 ml, te se dodaje 200 ml ekstrakcionog rastvora (tačka 3.8.). Sud se stavi u ultrazvučno kupatilo (tačka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučnog kupatila i 1 sat mučka na mješalici ili miješa magnetskom mješalicom (tačka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razblaži mobilnom fazom (tačka 3.6.) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa. 5 – 10 ml tako razblaženog rastvora filtrira se kroz membranski filter (tačka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (udio amproliuma ≥ 1 %)

Izmjeri se 1 – 4 g uzorka, zavisno o udjelu amproliuma, s preciznošću od 0,001 g, prenese u konusnu tikvicu zapremine 500 ml te se dodaje 200 ml ekstrakcionog rastvora (tačka 3.8.). Sud se stavi u ultrazvučno kupatilo (tačka 4.4.) i ostavi 15 minuta. Izvadi se iz ultrazvučnog kupatila i 1 sat mučka na mješalici ili miješa magnetskom mješalicom (tačka 4.5.). Alikvot ekstrakta se razblaži mobilnom fazom (tačka 3.6.) do udjela amproliuma od 0,5 – 2 µg/ml i promiješa. 5 – 10 ml tako razblaženog rastvora filtrira se kroz membranski filter (tačka 4.2.). Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.3.).

5.3. Određivanje na HPLC-u

5.3.1. Parametri:

Za određivanje HPLC mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju ekvivalentni rezultati.

Kolona za tečnu hromatografiju (tačka 4.1.1.):	125 mm × 4 mm, s izmjenom katjona (punjenje Nucleosil 10 SA, veličina čestica 5 ili 10 µm ili ekvivalentno)
Mobilna faza (tačka 3.6.):	Smješa acetonitrila (tačka 3.2.), rastvor natrijum dihidrogen fosfata (tačka 3.4.) i rastvor natrijum perhlorata (tačka 3.5.), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Brzina protoka:	0,7 – 1 ml/min
Talasna dužina detekcije:	264 nm
Zapremina za injektiranje	100 µl

Stabilnost hromatografskog sistema se provjerava injektovanjem kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3.) koncentracije 1,0 µg/ml sve dok se ne dobiju konstantne visine pikova i konstantna retenciona vremena

5.3.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.7.3.) te se za svaku koncentraciju izmjere srednje vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina (površina) pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.3.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.2.), pri čemu se koriste iste zapremine kao za kalibracioni rastvor, zatim se odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova amproliuma.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija rastvora uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova amproliuma u rastvoru uzorka iz kalibracijske krive (tačka 5.3.2.).

Udio amproliuma (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sljedećom formulom:

$$w = V \times c \times f / m \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

- V = zapremina ekstrakcionog rastvora (tačka 3.8.) u ml u skladu s tačkom 5.2. (tj. 200 ml)
- c = koncentracija amproliuma u ekstraktu uzorka (tačka 5.2.) u µg/ml
- f = faktor razblaženja u skladu s tačkom 5.2.
- m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka (tačka 5.2.) i spektar kalibracijskog rastvora (tačka 3.7.3.) koncentracije 2,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka (tačka 5.2.) dodaje se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.7.3.). Količina dodatog amproliuma mora biti slična procijenjenoj količini amproliuma u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pikova amproliuma uzimajući u obzir dodate količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika, na polovini maksimalne visine, mora biti unutar ± 10 % početne širine amproliuma u ekstraktu uzorka bez dodatog amproliuma.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

(a) Talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pikova hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm.

(b) Između 210 i 320 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar raspona 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita.

(c) Između 210 i 320 nm, spektri krive rasta, najviše tačke pikova i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar raspona 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, ne smije prijeći:

- 15 % više vrijednosti za udio amproliuma od 25 – 500 mg/kg,
- 75 mg/kg za udio amproliuma od 500 – 1 000 mg/kg,
- 7,5 % više vrijednosti za udio amproliuma veći od 1 000 mg/kg.

7.3. Iskorišćenje (Recovery)

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorišćenje iznosi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijskih ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje u kojem se analiziralo tri uzorka hrane za živinu (uzorci 1 – 3), jedan uzorak mineralne hrane za životinje (uzorak 4) i jedan uzorak premiksa (uzorak 5). Rezultati su dati u sljedećoj tabeli:

	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	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	-	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	-	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	-	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	-	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominalni udio [mg/kg]	-	50	200	5 000	25 000

L = broj laboratorija
 n = broj pojedinačnih vrijednosti
 s_r = standardna devijacija ponovljivosti
 CV_r = koeficijent varijacije ponovljivosti
 s_R = standardna devijacija obnovljivosti
 CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti

9. Napomene

9.1. Ako uzorak sadrži tiamin, pik tiamina u hromatogramu pojavljuje se malo prije pika amproliuma. U skladu sa ovom metodom, amprolium i tiamin se moraju razdvojiti. Ako se amprolium i tiamin ne razdvajaju na koloni (tačka 4.1.1.) korišćenoj u ovoj metodi, metanolom se zamijeni do 50 % acetonitrila u mobilnoj fazi (tačka 3.6.).

9.2. Prema Britanskoj farmakopeji, najviše tačke spektra rastvora amproliuma ($c = 0,02$ mol/l) u hlrovodičnoj kiselini ($c = 0,1$ mol/l) nalaze se na 246 nm i 262 nm. Apsorpcija iznosi 0,84 na 246 nm i 0,80 na 262 nm.

9.3. Ekstrakt se uvijek mora razblažiti mobilnom fazom, u suprotnom bi se retenciono vrijeme amproliuma moglo znatno pomjeriti zbog promjena jonske sile.

Dio IV ODREĐIVANJE NIVOA KARBADOKSA *Metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N^1, N^4 -dioksid*

1. Predmet i područje primjene

Određivanje nivoa karbadoksa u hrani za životinje, premiksima i preparatima vrši se prema sljedećoj metodi. Granica detekcije iznosi 1 mg/kg. Granica kvantifikacije je 5 mg/kg.

2. Princip

Uzorak se uravnoteži vodom i ekstrahuje metanol-acetonitrilom. Kod hrane za životinje prečisti se alikvotni dio filtriranog ekstrakta na koloni od aluminijum oksida. Kod premiksa i preparata alikvotni se dio filtriranog ekstrakta razblaži do odgovarajuće koncentracije vodom, metanolom i acetonitrilom. Udio karbadoksa određuje se tečnom hromatografijom visoke efikasnosti (HPLC) s reverznom fazom uz upotrebu UV detektora.

3. Reagensi

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitril, za HPLC.

3.3. Sirćetna kiselina, $m = 100\%$.

3.4. Aluminijum oksid: neutralni, stepena aktivnosti I.

3.5. Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v).

Pomiješa se 500 ml metanola (tačka 3.1.) s 500 ml acetonitrila (tačka 3.2.).

3.6. Sirćetna kiselina, $\sigma = 10\%$.

Vodom se razblaži 10 ml sirćetne kiseline (tačka 3.3.) do 100 ml.

3.7. Natrijum acetat.

3.8. Voda, za HPLC.

3.9. Rastvor acetatnog pufera, $c = 0,01$ mol/l, $pH = 6,0$.

Rastvori se 0,82 g natrijum acetata (tačka 3.7.) u 700 ml vode (tačka 3.8.), pH vrijednost se sirćetnom kiselinom (tačka 3.6.) podesi na 6,0. Prenese se u sud zapremine 1 000 ml, dopuni vodom (tačka 3.8.) do oznake i promiješa.

3.10. Mobilna faza za HPLC

Pomiješa se 825 ml rastvora acetatnog pufera (tačka 3.9.) sa 175 ml acetonitrila (tačka 3.2.).

Filtrira se kroz filter 0,22 μm (tačka 4.5.) i degasira (npr. 10 minuta u ultrazvučnom kupatilu).

3.11. Standardna materija

Čisti karbadoks: metil 3-(2-kinoksalinilmetilen)karbazat N^1, N^4 -dioksid, E 850

3.11.1. Osnovni rastvor standarda karbadoksa, 100 $\mu g/ml$:

Izmjeri se 25 mg standardne materije karbadoksa (tačka 3.11.) s preciznošću od 0,1 mg i prenese u sud zapremine 250 ml. Rastvori se u metanol-acetonitrilu (tačka 3.5.) obradom u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.7.). Nakon tretiranja u ultrazvučnom kupatilu, rastvor se zagrije do sobne temperature, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (tačka 3.5.) i promiješa. Sud se omota aluminijском folijom ili se koristi sud od tamnog stakla i čuva u frižideru. Na temperaturi $\leq 4^\circ C$ rastvor je stabilan 1 mjesec.

3.11.2. Kalibracioni rastvori

U seriju sudova zapremine 100 ml prenese se 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml osnovnog rastvora standard (tačka 3.11.1.). Doda se 30 ml vode, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (tačka 3.5.) i promiješa. Sudovi se omotaju aluminijском folijom. Ovi rastvori odgovaraju koncentracijama karbadoksa od 2,0, 5,0, 10,0, i 20,0 $\mu g/ml$.

Kalibracione rastvore treba pripremiti svježe prije upotrebe.

Napomena: Za određivanje karbadoksa u hrani za životinje koja sadrži manje od 10 mg/kg karbadoksa, moraju se pripremiti kalibracioni rastvori čija je koncentracija manja od 2,0 $\mu g/ml$.

3.12. Smješa voda-[metanol-acetonitril] (tačka 3.5.), 300 + 700 (v + v)

Pomiješa se 300 ml vode sa 700 ml smjese metanola i acetonitrila (tačka 3.5.).

4. Oprema

4.1. Laboratorijski šejker ili magnetska mješalica.

4.2. Filter papir od staklenih vlakana (Whatman GF/A ili ekvivalentni).

4.3. Staklena kolona (dužine 300 do 400 mm, unutrašnji promjer približno 10 mm) sa sinterovanim staklenim filterom i ispusnom slavinom.

Napomena: Može se koristiti staklena kolona sa slavinom ili staklena kolona bez slavine; u tom slučaju se u donji kraj umetne mali jastučić od staklene vune i staklenim štapićem potisne na dno.

4.4. Oprema za HPLC sa injektorskim sistemom, primjerenim za injektiranje zapremine od 20 μl .

4.4.1. Kolona za tečnu hromatografiju: 300 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , s veličinom čestica punjenja 10 μm ili ekvivalentna.

4.4.2. UV detektor s mogućnošću promjene talasne dužine ili detektor s nizom dioda u području 225 do 400 nm.

4.5. Membranski filter, 0,22 μm .

4.6. Membranski filter, 0,45 μm .

4.7. Ultrazvučno kupatilo.

5. Postupak

Napomena: Karbadoks je osjetljiv na svjetlo. Svi se postupci izvode pod prigušenim svjetlom ili u laboratorijskom posuđu od tamnog stakla ili u posuđu omotanom aluminijском folijom.

5.1. Opšte

5.1.1. Slijepa proba hrane za životinje

Kod primjene testa iskorišćenja (tačka 5.1.2.) analizom slijepa probe hrane za životinje utvrđuje se da nisu prisutni ni karbadoks niti interferentne materije. Slijepa proba hrane za životinje mora biti slične vrste kao i uzorak, a analizom se u njoj ne smiju pronaći karbadoks niti interferentne materije.

5.1.2. Test iskorišćenja (Recovery)

Test iskorišćenja sprovodi se analizom slijepa probe hrane za životinje (tačka 5.1.1.) u koju se doda količina karbadoksa slična količini u uzorku. Kako bi se dobila koncentracija od 50 mg/kg, prenese se 5,0 ml osnovnog rastvora standarda (tačka 3.11.1.) u konusnu tikvicu zapremine 200 ml. Rastvor se upari do približno 0,5 ml pod strujom azota. Doda se 10 g slijepa probe hrane za životinje, promiješa i ostavi 10 minuta prije prelaska na postupak ekstrakcije (tačka 5.2.).

Ako nije dostupna slijepa proba hrane za životinje slična uzorku, test iskorišćenja može se umjesto toga sprovesti metodom dodavanja standarda. U tom slučaju se uzorku za analizu doda količina karbadoksa slična onoj u uzorku. Taj se uzorak analizira zajedno s uzorkom bez dodatog karbadoksa, a iskorišćenje se izračunava oduzimanjem.

5.2. Ekstrakcija

5.2.1. Hrana za životinje

Izmjeri se 10 g uzorka sa preciznošću od 0,01 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 200 ml. Doda se 15,0 ml vode, promiješa i ostavi pet minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 ml metanol-acetonitrila (tačka 3.5), začepi i trese 30 minuta na šejkeru ili miješa magnetnom mješalicom (tačka 4.1.). Rastvor se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (tačka 4.2.). Ovaj se rastvor čuva za fazu prečišćavanja (tačka 5.3.).

5.2.2. Premiksi (0,1 – 2,0 %)

Izmjeri se 1 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 200 ml. Doda se 15,0 ml vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 35,0 ml metanol-acetonitrila (tačka 3.5), začepi i promućka 30 minuta na šejkeru ili miješa magnetnom mješalicom (tačka 4.1.). Rastvor se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (tačka 4.2.).

Alikvot filtrata se pipetom prenese u sud zapremine 50 ml. Doda se 15,0 ml vode, dopuni do oznake metanol-acetonitrilom (tačka 3.5.) i promiješa. Koncentracija karbadoksa u konačnom rastvoru iznosi približno 10 µg/ml. Alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (tačka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja putem HPLC-a (tačka 5.4.).

5.2.3. Preparati (> 2 %)

Izmjeri se 0,2 g neusitnjenog uzorka s preciznošću od 0,001 g i prenese u konusnu tikvicu zapremine 250 ml. Doda se 45,0 ml vode, promiješa i ostavi 5 minuta da se uravnoteži. Doda se 105,0 ml metanol-acetonitrila (tačka 3.5), začepi i homogenizuje. Uzorak se drži 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu (tačka 4.7.), zatim se 15 minuta protresa ili miješa (tačka 4.1.). Rastvor se filtrira kroz filter papir od staklenih vlakana (tačka 4.2.).

Alikvot filtrata razrijedi se smjesom vode, metanola i acetonitrila (tačka 3.12.) tako da konačna koncentracija karbadoksa iznosi 10 – 15 µg/ml (za 10 %-tni preparat faktor razblaženja je 10). Alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (tačka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja na HPLC-u (tačka 5.4.).

5.3. Prečišćavanje

5.3.1. Priprema kolone aluminijum oksida

Izmjeri se 4 g aluminijum oksida (tačka 3.4.) i prenese u staklenu kolonu (tačka 4.3.).

5.3.2. Prečišćavanje uzorka

Kroz kolonu od aluminijum oksida propusti se 15 ml filtriranog ekstrakta (tačka 5.2.1.), a prva 2 ml eluata se odbace. Prikupi se sledećih 5 ml, alikvot se filtrira kroz filter 0,45 µm (tačka 4.6.).

Prelazi se na postupak određivanja na HPLC-u (tačka 5.4.).

5.4. Određivanje na HPLC-u

5.4.1. Parametri

Sledeći se uslovi predlažu kao smjernice; mogu se koristiti i drugi uslovi ako se njima garantuju jednakovrijedni rezultati:

Kolona za tačnu hromatografiju (tačka 4.4.1.):	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , s veličinom čestica punjenja 10 µm ili ekvivalentna
Mobilna faza (tačka 3.10.):	Smjesa rastvora acetatnog pufera (tačka 3.9.) i acetonitrila (tačka 3.2.), 825 + 175 (v + v)
Brzina protoka:	1,5 – 2 ml/min
Talasna dužina detekcije:	365 nm
Zapremina injektiranja:	20 µl

Stabilnost hromatografskog sistema proverava se injektiranjem kalibracionog rastvora (tačka 3.11.2.) koncentracije 5,0 µg/ml, sve dok se ne dobiju konstantne visine (površine) pikova i konstantna retenciona vremena.

5.4.2. Kalibraciona kriva

Više puta se injektira svaki kalibracioni rastvor (tačka 3.11.2.) i za svaku koncentraciju izmjere vrijednosti visina (površina) pikova. Kalibraciona kriva se pripremi tako da se na ordinatu nanose srednje vrijednosti visina ili površina pikova kalibracionih rastvora, a na apscisu odgovarajuće koncentracije u µg/ml.

5.4.3. Rastvor uzorka

Više puta se injektira ekstrakt uzorka (tačka 5.3.2.) za hranu za životinje, (tačka 5.2.2.) za premikse i (tačka 5.2.3.) za preparate i odredi srednja vrijednost visina (površina) pikova karbadoksa.

6. Izračunavanje rezultata

Koncentracija karbadoksa u rastvoru uzorka u µg/ml određuje se iz srednjih vrijednosti visina (površina) pikova karbadoksa u rastvoru uzorka iz kalibracione krive (tačka 5.4.2.).

6.1. Hrana za životinje

Udio karbadoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times V_1 / m \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (tačka 5.3.2.) u µg/ml

V₁ = zapremina ekstrakta u ml (tj. 50)

m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

6.2. Premiksi i preparati

Udio karbadoksa (w) (mg/kg) u uzorku izračunava se sledećom formulom:

$$w = c \times V_2 \times f / m \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

c = koncentracija karbadoksa u ekstraktu uzorka (tačka 5.2.2. ili 5.2.3.) u µg/ml

V₂ = zapremina ekstrakta u ml (tj. 50 za premikse; 150 za preparate)

f = faktor razblaženja u skladu sa tačkom 5.2.2. (premixi) ili 5.2.3. (preparati)

m = masa ispitivanog uzorka u gramima.

7. Validacija rezultata

7.1. Identifikacija

Identifikacija analita može se potvrditi ko-hromatografijom ili detektorom s nizom dioda kojim se upoređuje spektar ekstrakta uzorka i spektar kalibracionog rastvora (tačka 3.11.2.) koncentracije 10,0 µg/ml.

7.1.1. Ko-hromatografija

U ekstrakt uzorka doda se odgovarajuća količina kalibracionog rastvora (tačka 3.11.2.). Količina dodatog karbadoksa mora biti slična procijenjenoj količini karbadoksa u ekstraktu uzorka.

Dozvoljeno je povećanje samo visine pika karbadoksa uzimajući u obzir dodatke količine i razblaženje ekstrakta. Širina pika, na polovini maksimalne visine, mora biti unutar ±10% početne širine.

7.1.2. Detektor s nizom dioda

Rezultati se ocjenjuju u skladu sa sledećim kriterijumima:

- (a) talasne dužine maksimalne apsorpcije spektra uzorka i spektra standarda, zabilježene na najvišoj tački pikova hromatograma, moraju biti jednake unutar granice određene razlučivošću sistema za detekciju. Kod detektora s nizom dioda ta se vrijednost obično nalazi unutar ± 2 nm;
- (b) između 225 i 400 nm, spektar uzorka i spektar standarda, zabilježeni na najvišoj tački pika hromatograma, ne smiju se razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije standardnog analita;
- (c) između 225 i 400 nm, spektri krive rasta, najviše tačke vrha i krive pada dobijeni iz ekstrakta uzorka, ne smiju se međusobno razlikovati za dijelove spektra unutar područja 10 – 100 % relativne apsorpcije. Taj kriterijum je ispunjen kada su prisutne jednake najviše vrijednosti i kada odstupanje između dva spektra ni na jednoj tački ne prelazi 15 % apsorpcije spektra najviše tačke.

Ako nije ispunjen jedan od navedenih kriterijuma, prisutnost analita nije potvrđena.

7.2. Ponovljivost (Repeatability)

Razlika između rezultata dva uporedna postupka određivanja, izvedenih na istom uzorku, za udio od 10 mg/kg i više ne smije prijeći 15 % vrijednosti višeg rezultata.

7.3. Iskorišćenje(Recovery)

Kod obogaćenog (slijepog) uzorka iskorišćenje iznosi najmanje 90 %.

8. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Međulaboratorijsko ispitivanje u kojem se u osam laboratorija analiziralo šest uzoraka hrane za životinje, četiri uzorka premiksa i tri uzorka preparata. Svaki uzorak je analiziran dvaput. (Podrobnije informacije o navedenom međulaboratorijskom ispitivanju mogu se pronaći u *Journal of AOAC*, dio 71, 1988., str. 484. – 490.) Rezultati (bez ekstremnih vrijednosti) su dati u sledećim tabelama:

Tabela 1.
Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja 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
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	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

Tabela 2.
Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja za premikse i preparate

	Premiksi				Preparati		
	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
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	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
Sr = standardna devijacija ponovljivosti
CVr = koeficijent varijacije ponovljivosti
S_R = standardna devijacija obnovljivosti
CV_R = koeficijent varijacije obnovljivosti